



REC'D 22 MAR 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

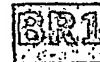
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 *9/ 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 24 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 21 DEC. 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif) BLO/CGA/cp644/88FR		<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE " CABINET ORES. 36 rue de St Petersburg 75008 PARIS	
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
23 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
24 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS.			
25 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
26 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public _____ _____ 3 rue Michel-Ange [7 5 7 9 4] PARIS Cedex 16 FRANCE Française	
Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		N° de télécopie (facultatif) <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 04 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0216648 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		ORES
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36 rue de St Petersburg
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00.
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88.
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : RG		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS <input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M ROCHET

Nouvelle protéine associée aux centrosomes et ses applications.

La présente invention est relative à une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide.

5 Le processus de division cellulaire consiste en une division nucléaire (mitose) suivie d'une division cytoplasmique (cytokinèse). La mitose est dominée par la formation d'un fuseau polaire très organisé (le fuseau mitotique) constitué de deux familles de microtubules : les microtubules polaires et les microtubules kinétochoriens. Les microtubules sont des polymères composés de sous-unités d' α - et β -tubuline. Leur croissance est initiée dans la région périphérique du centrosome par un complexe contenant majoritairement une protéine apparentée, la γ -tubuline. Les microtubules polaires sont composés de rangées de microtubules et de protéines associées qui sont mises en place par les deux centres mitotiques, associés à des centrioles, situés aux pôles opposés du fuseau (asters). Chaque chromosome répliqué est constitué de deux chromatides sœurs reliées entre elles par le centromère. Les microtubules kinétochoriens sont liés aux chromosomes répliqués par des structures spécialisées appelées kinétochores qui se forment au cours de la prophase sur chacune des deux faces du centromère. 15 Les chromosomes se condensent pendant la prophase et forment les microtubules kinétochoriens qui commencent à interagir avec les microtubules polaires du fuseau après rupture de l'enveloppe nucléaire au cours de la prométaphase. Sous l'effet de la tension due aux forces opposées, dirigées vers les pôles qui tirent les microtubules kinétochoriens, les chromosomes s'alignent dans la zone équatoriale du fuseau pendant la métaphase. A l'anaphase, sous l'effet de forces continuellement développées au sein du fuseau mitotique, les chromatides sœurs se détachent et sont attirées vers les pôles opposés. Dans le même temps, les deux pôles cellulaires s'écartent. Au cours de la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme à la surface de chaque 25 groupe de chromosomes. 30

La division cellulaire s'achève au moment où le contenu cytoplasmique est divisé selon le processus de cytokinèse. Le fuseau mitotique joue un rôle important dans le processus de cytokinèse, en fixant la mise en place de la segmentation cellulaire. Le sillon de division apparaît invariablement dans le plan de la plaque équatoriale, perpendiculairement à l'axe du 35 fuseau mitotique.

Les processus décrits ci-dessus sont finement régulés par un équilibre entre des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation.

Lorsque la cellule entre en mitose, des changements importants dans la phosphorylation des protéines interviennent. Le centrosome et le fuseau mitotique sont particulièrement enrichis en sites phosphorylés. De nombreuses protéine-kinases, particulièrement des sérine-thréonine-kinases, ont été décrites comme intervenant dans ces processus de phosphorylation (voir à cet égard Giet R. et Prigent C., J. Cell Science, 112, 3591-3601, 1999). Parmi celles-ci on citera celles localisées au niveau des centrosomes, parmi

lesquelles les kinases de type aurora, requises pour la séparation des centrosomes et l'assemblage du fuseau mitotique, les kinases de type polo, impliquées dans la maturation et la formation du fuseau bipolaire et les kinases de type NIMA qui régulent la séparation des centrosomes.

Les mammifères possèdent au moins trois protéine-kinases du type aurora. Chez l'homme, ces trois protéine-kinases sont surexprimées dans des pathologies cancéreuses du fait d'anomalies chromosomiques. Ainsi, ces protéines semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la ploïdie. Par exemple, une inactivation ou une surexpression de deux de ces kinases conduit à une polyploïdie. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora A conduit à la formation de fuseaux monopolaires. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora B conduit à la formation de cellules multinucléées par défaut de cytokinèse. Ces anomalies chromosomiques apparaissent liées à des perturbations dans la formation du fuseau mitotique.

Les partenaires et les substrats de ces protéine-kinases sont encore peu connus. Par exemple, chez le xénope, aurora A interagit avec une kinésine impliquée dans la dynamique des microtubules. Chez l'homme, elle phosphoryle la protéine HsTACC-3, également surexprimée dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Chez la drosophile, aurora A phosphoryle la protéine D-TACC et est nécessaire à sa localisation aux centrosomes afin de réguler les microtubules astraux. D-TACC interagit avec la protéine associée aux microtubules (MAP : Microtubule Associated Protein) Msp, qui fait partie de la famille des protéines XMAO215/ch-TOC/Msps, qui stimulent la croissance des microtubules *in vitro* et sont concentrées au niveau des centrosomes *in vivo*. D-TACC et Msp coopèrent pour stabiliser les centrosomes. Le terme MAP regroupe une collection de protéines variées définies sur la base de leur capacité à interagir avec les microtubules. Les

MAP apparaissent comme des partenaires/substrats des kinases du centrosome comme aurora ou polo.

5 Une division cellulaire correcte nécessite une coordination entre la ségrégation des chromosomes par le fuseau mitotique et le clivage de la cellule par l'appareil de cytokinèse. Les microtubules du fuseau mitotique jouent un rôle essentiel dans le deux processus.

10 Cependant, malgré l'ensemble des travaux réalisés sur la division cellulaire, les facteurs intervenant dans une mise en place correcte du fuseau mitotique et/ou au contraire perturbant sa mise en place et/ou sa structure, entraînant ainsi les conséquences ci-dessus décrites ne sont toujours pas connus.

15 Une telle connaissance permettrait d'une part de mieux comprendre les mécanismes de la mitose et d'autre part de pouvoir développer des moyens de lutter contre les anomalies de la division cellulaire et les conséquences qu'elles entraînent.

C'est dans ce domaine que se place la présente invention.

20 En effet, de manière surprenante et inattendue, les Inventeurs ont mis en évidence une nouvelle protéine humaine associée aux centrosomes. Par immunofluorescence, elle est détectée en colocalisation avec l' α -tubuline des microtubules du fuseau mitotique, en particulier avec l'aster. Cette protéine a été nommée ASAP pour Aster Associated Protein (Protéine Associée à l'Aster) par les Inventeurs.

25 La surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires). Sa surexpression bloque la division cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire.

Ainsi, l'invention a pour objet une protéine isolée, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

30 a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°1 ;

b) une protéine comportant, sur sa totalité, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou au moins 95% de similarité, avec la protéine SEQ ID N°1.

Une protéine conforme à l'invention se caractérise par les propriétés suivantes :

- elle présente un poids moléculaire compris entre 60 et 100 kDa, de préférence entre 65 et 80 kDa ;
- 5 - elle est associée aux centrosomes ;
- elle est colocalisée par immunofluorescence avec l' α -tubuline des microtubules du fuseau mitotique ;
- elle présente une faible identité (23%) avec la protéine MAP1A (Microtubule Associated Protein 1A) ;
- 10 - elle présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine s'oligomériser, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines ;
- elle présente une faible identité (20%), entre les acides aminés 300 et 600 avec un domaine de type caldesmon (Gusev, N.B., Biochemistry, 10 : 1112-1121, 2000), référencé pfam00769 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam00769>), et, entre les acides aminés 480 et 630, avec un domaine de type ERM (Ezrin/radixin/moesin ; Louvet-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), référencé pfam02029 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam02029>). Les protéines caldesmon et ERM sont également considérées comme des MAP ;
- 15 - elle présente également, entre les positions 65 et 303, un domaine BRCT, (Breast cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., , FASEB J., 11, 68-76 (1997)), protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire ;
- 20 - elle présente une grande richesse en hélices α dans sa partie C-terminale, en particulier dans la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formées d'hélices α .

30 Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

Les protéines selon l'invention incluent toute protéine (naturelle, synthétique, semi-synthétique ou recombinante) de n'importe quel orga-

nisme procaryote ou eucaryote, notamment d'un mammifère, comprenant ou consistant en une protéine ASAP. Préférentiellement, ladite protéine est une protéine ASAP fonctionnelle.

On entend par "fonctionnelle", une protéine possédant une activité biologique normale, c'est à dire capable d'intervenir dans l'organisation du fuseau mitotique et dans la division cellulaire. Cette protéine peut comprendre des mutations silencieuses n'induisant aucun changement substantiel dans son activité et ne produisant aucune modification phénotypique.

Sont incluses dans les protéines selon l'Invention définies en b), les protéines variantes de la séquence SEQ ID N°1, en particulier les protéines dont la séquence en acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, une délétion, une substitution et/ou une addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport à la séquence SEQ ID N°1.

De manière préférée, les protéines variantes présentent une mutation entraînant un dysfonctionnement (activation ou inhibition) de la protéine, d'autres gènes ou protéines ou encore de la cellule en général.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'Invention, ladite protéine est une protéine de mammifère, préférentiellement une protéine d'origine humaine.

Au sens de la présente Invention les définitions suivantes s'appliquent.

L'identité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les deux séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % d'identité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence de référence, tout en conservant les propriétés fonctionnelles de ladite protéine de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altération inclut les délétions, les

substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

La similarité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives, lorsque les deux séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente Invention, on entend par substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques ou physiques similaires (taille, charge ou polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % de similarité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations non-conservatives pour 100 acides aminés de la séquence de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altérations non-conservatives inclut les délétions, les substitutions non-conservatives ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

Par "techniques ou méthodes bien connues de l'homme du métier" on entend ici se référer aux techniques ou méthodes classiquement utilisées par l'homme du métier et exposées dans de nombreux ouvrages, comme en particulier celui intitulé Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press).

La protéine selon l'Invention est obtenue soit à partir d'une cellule, soit par synthèse chimique, soit par recombinaison génétique.

Par synthèse chimique, la protéine peut être obtenue en utilisant l'une des nombreuses voies de synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Dans ce cas, la séquence de la protéine peut être modifiée afin d'améliorer sa solubilité, en particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

La protéine selon l'invention est constituée de l'enchaînement de 13 peptides correspondants aux produits de traduction de 13 des 14 exons que comporte le gène correspondant, le premier exon n'étant pas traduit (voir ci-après).

5 De manière plus précise, lesdits peptides répondent aux séquences suivantes (positions données par rapport à la numérotation de la séquence SEQ ID N°1) :

- Peptide 1 : il comprend 25 acides aminés correspondants aux positions 1 à 25 (SEQ ID N° 2) ;
- 10 - Peptide 2 : il comprend 28 acides aminés correspondants aux positions 26 à 53 (SEQ ID N° 3) ;
- Peptide 3 : il comprend 107 acides aminés correspondants aux positions 54 à 160 (SEQ ID N° 4) ;
- Peptide 4 : il comprend 76 acides aminés correspondants
15 aux positions 161 à 236 (SEQ ID N° 5) ;
- Peptide 5 : il comprend 31 acides aminés correspondants aux positions 237 à 267 (SEQ ID N° 6) ;
- Peptide 6 : il comprend 83 acides aminés correspondants aux positions 268 à 350 (SEQ ID N° 7) ;
- 20 - Peptide 7 : il comprend 24 acides aminés correspondants aux positions 351 à 374 (SEQ ID N° 8) ;
- Peptide 8 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 375 à 428 (SEQ ID N° 9) ;
- Peptide 9 : il comprend 32 acides aminés correspondants
25 aux positions 429 à 460 (SEQ ID N° 10) ;
- Peptide 10 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 461 à 514 (SEQ ID N° 11) ;
- Peptide 11 : il comprend 49 acides aminés correspondants aux positions 515 à 563 (SEQ ID N° 12) ;
- 30 - Peptide 12 : il comprend 43 acides aminés correspondants aux positions 564 à 606 (SEQ ID N° 13) ;

- Peptide 13 : il comprend 41 acides aminés correspondants aux positions 607 à 647 (SEQ ID N° 14).

La présente Invention a aussi pour objet un peptide constitué d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine définie ci-dessus en a) ou b), particulièrement un peptide sélectionné parmi les séquences correspondant aux peptides 1 à 13 décrits ci-dessus, c'est-à-dire sélectionné parmi les séquences SEQ ID N°2 à SEQ ID N°14.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit peptide est utile pour la production d'anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine telle que définie ci-dessus, préférentiellement reconnaissant la protéine ASAP de séquence SEQ ID N°1.

L'Invention a ainsi également pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement une protéine selon l'Invention.

De manière préférentielle selon l'Invention, les anticorps reconnaissent, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID N°1.

Les anticorps selon l'Invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal délectable et/ou quantifiable.

Lesdits anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain ou à partir de sérum d'animaux immunisés avec les protéines où les peptides selon l'Invention. Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon les techniques bien connues de l'Homme du Métier.

L'Invention a également pour objet l'utilisation des anticorps selon l'Invention pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'Invention.

De manière générale, les anticorps selon l'Invention peuvent être avantageusement utilisés pour détecter la présence d'une protéine selon l'Invention, normale ou mutée.

Particulièrement, les anticorps monoclonaux, peuvent être utilisés pour la détection de ces protéines dans un échantillon biologique. Ils

constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des protéines selon l'Invention, notamment la protéine de séquence SEQ ID N°1, sur des coupes de tissus. Généralement pour de telles analyses, les anticorps utilisés sont marqués afin d'être détectables par exemple par des composés immunofluorescents, par marquage à l'or ou sous forme d'immunoconjugués enzymatiques.

Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces protéines dans les tissus ou prélèvements biologiques et ainsi permettre la détection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'Invention.

L'Invention a également pour objet une méthode de détection dans un échantillon biologique de la protéine selon l'Invention, particulièrement de la protéine ASAP, comprenant une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention et une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

Cette méthode peut en outre permettre de mesurer le taux d'expression de la protéine selon l'Invention dans des cellules, particulièrement dans des cellules cancéreuses. L'étude de l'expression de la protéine ASAP (sur- ou sous-expression) est un élément d'évaluation de la capacité de prolifération ou d'agressivité (capacité à évoluer vers des cancers de mauvais pronostic) de cellules cancéreuses.

L'Invention a donc également pour objet une méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité des cellules cancéreuses contenues dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention, une troisième étape de mise en évidence et/ou de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et une quatrième étape d'évaluation du taux de

transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique contenant des cellules présentant un taux de protéines normal ou
 5 altéré, auquel ladite méthode est appliquée dans les mêmes conditions.

L'Invention a également pour objet une trousse permettant de mettre en œuvre l'une quelconque des méthodes ci-dessus décrites comprenant :

~~a) au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon~~
 10 l'Invention ;

b) les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'Invention, la trousse peut éventuellement comprendre des réactifs nécessaires pour rendre
 15 accessible le milieu intracellulaire.

Par moyen pour rendre accessible le milieu intracellulaire, on entend tout moyen connu de l'Homme du Métier comme par exemple la lyse cellulaire par voie enzymatique, chimique ou encore la sonication, la perméation membranaire, les chocs thermiques.

20 La présente Invention a également pour objet un polynucléotide isolé (ADNc ou fragment d'ADN génomique), caractérisé en ce qu'il comprend ou répond à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les polynucléotides codant pour une protéine ou un peptide tels que définis ci-dessus, et
 - les polynucléotides complémentaires des précédents, sens ou anti-sens.
- 25

L'Invention englobe, les allèles du gène *asap* issus de n'importe quel mammifère, ainsi que les polynucléotides des mutants naturels ou artificiels du gène *asap* codant pour une protéine ASAP, particulièrement
 30 pour une protéine ASAP fonctionnelle telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit polynucléotide codant pour une protéine ASAP comprend ou répond à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

5 - la séquence SEQ ID N°15, correspondant à l'ADN complémentaire de 2575 nucléotides de l'ARNm codant pour la protéine hASAP ;

10 - le fragment d'ADN génomique de 29750 nucléotides répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°16, correspondant au gène *asap* humain comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant pas traduit, contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204 paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3 NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), par ailleurs localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053 et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb).

15 La séquence SEQ ID N°16 est contenue dans le clone BAC RP11-27G13 (Osoegawa, K., et col., (2001) A Bacterial Artificial Chromosome Library for Sequencing the Complete Human Genome, Genome Research, Vol. 11, n°3, 483-496, mars 2001). Les séquences contenues dans le contig AC097467 et dans le clone BAC RP11-27G13 ont été obtenues dans le cadre
20 du programme de séquençage du génome humain et n'ont jusqu'à présent fait l'objet d'aucune reconnaissance ni caractérisation précises permettant de leur attribuer une quelconque fonction. Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et
25 AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941,
30 AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742,
35 BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439,

BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, 5 AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et n'ont jamais été ni reconnues ni caracté-

10 sées. En fait, le polynucléotide isolé par les Inventeurs présente de longs enchaînements de désoxyadénosines (poly-dA), ce qui explique les difficultés rencontrées par les Inventeurs pour obtenir l'ADNc complet par utilisation d'amorces oligo-désoxythymidines (oligo-dT) classiques, celles-ci s'hybridant de manière aléatoire avec les enchaînements poly-dA. C'est par l'utilisation 15 répétée de la technique de l'amplification rapide des extrémités 3' d'ADNc (3' Rapid Amplification cDNA end ou 3'RACE) que les Inventeurs sont parvenus à isoler le polynucléotide correspondant à l'ARNm complet.

L'ARNm, correspondant au polynucléotide de séquence SEQ ID N°15, est spécifiquement exprimé dans le testicule sous la forme d'un 20 polynucléotide d'une longueur d'environ 2,9 kilobases et dans le cerveau sous la forme d'un polynucléotide d'une longueur d'environ 9 kilobases pouvant correspondre soit à un pré-messager soit à une isoforme de haut poids moléculaire.

De manière plus précise, lesdits exons sont répartis comme 25 suit sur ladite séquence génomique (par rapport à la numérotation de la séquence SEQ ID N°16) :

- exon 1 : il comprend 200 paires de bases correspondant aux positions 101 à 300 (SEQ ID N°17) ;
- exon 2 : il comprend 139 paires de bases correspondant aux 30 positions 1157 à 1295 (SEQ ID N°18) ;
- exon 3 : il comprend 85 paires de bases correspondant aux positions 2050 à 2134 (SEQ ID N°19) ;
- exon 4 : il comprend 321 paires de bases correspondant aux positions 3615 à 3935 (SEQ ID N°20) ;

- exon 5 : il comprend 227 paires de bases correspondant aux positions 8259 à 8485 (SEQ ID N°21) ;

- exon 6 : il comprend 94 paires de bases correspondant aux positions 14930 à 15023 (SEQ ID N°22) ;

5 - exon 7 : il comprend 248 paires de bases correspondant aux positions 16715 à 16962 (SEQ ID N°23) ;

- exon 8 : il comprend 71 paires de bases correspondant aux positions 19552 à 19622 (SEQ ID N°24) ;

10 - exon 9 : il comprend 169 paires de bases correspondant aux positions 21187 à 21355 (SEQ ID N°25) ;

- exon 10 : il comprend 90 paires de bases correspondant aux positions 21911 à 22000 (SEQ ID N°26) ;

- exon 11 : il comprend 162 paires de bases correspondant aux positions 23731 à 23892 (SEQ ID N°27) ;

15 - exon 12 : il comprend 146 paires de bases correspondant aux positions 24014 à 24159 (SEQ ID N°28) ;

- exon 13 : il comprend 133 paires de bases correspondant aux positions 24343 à 24475 (SEQ ID N°29) ;

20 - exon 14 : il comprend 485 paires de bases correspondant aux positions 29166 à 29650 (SEQ ID N°30) ;

L'invention a aussi pour objet :

- un fragment de l'un quelconque des polynucléotides selon l'invention, d'au moins 15 à 1500 nucléotides consécutifs à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, 25 AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, 30

BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293,
 BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289,
 BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226,
 BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089,
 5 BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277,
 AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418,
 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559,
 BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296,
 BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans

10 la base de données GenBank, particulièrement un fragment sélectionné parmi
 les séquences correspondants aux exons c'est-à-dire sélectionné parmi les
 séquences SEQ ID N°16 à SEQ ID N°30 ;

- un acide nucléique présentant un pourcentage d'identité
 d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, avec l'un des poly-
 15 nucléotides selon l'invention.

La définition de l'identité d'une séquence donnée précédem-
 ment pour les protéines, s'applique par analogie aux molécules d'acide
 nucléique.

Sont inclus dans un polynucléotide présentant un pourcentage
 20 d'identité d'au moins 80 %, de préférence au moins 90 %, selon l'invention,
 les polynucléotides variants de la séquence SEQ ID N°15, c'est-à-dire
 l'ensemble des polynucléotides correspondants à des variants alléliques,
 c'est-à-dire à des variations individuelles de la séquence SEQ ID N°15. Ces
 séquences variantes naturelles correspondent à des polymorphismes
 25 présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notam-
 ment à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une pathologie.

On entend également désigner par polynucléotide variant, tout
 ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou d'une variation d'un site
 d'épissage de la séquence génomique dont l'ARNm a comme ADN complé-
 30 mentaire le polynucléotide de séquence SEQ ID N°15.

De préférence, la présente invention concerne les poly-
 nucléotides ou les fragments variants de la séquence SEQ ID N°15, particulièrement ceux dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de
 la séquence en acides aminés de la protéine codée par la séquence SEQ ID
 35 N°1.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent être isolés à partir de cellules, particulièrement des cellules de testicule ou de cerveau ou à partir de banques d'ADN cellulaire. Ils peuvent également être obtenus par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) effectuée sur l'ADN total des
 5 cellules ou encore par RT-PCR effectuée sur les ARN totaux des cellules ou par synthèse chimique.

Les polynucléotides selon l'invention, particulièrement les fragments de l'un quelconque des polynucléotides selon l'invention, et les
 10 séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132,
 15 AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293,
 20 BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418,
 25 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou leurs fragments, peuvent notamment être
 30 utilisés comme sondes ou comme amorces pour détecter/amplifier des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide selon l'invention, particulièrement dans d'autres organismes.

Les transcrits du gène *asap* sont par exemple de préférence mis en évidence à l'aide de sondes sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N°15, SEQ ID N° 17 à SEQ ID N° 44 ou à l'aide
 35 d'un EST tel que défini ci-dessus ou amplifiés par RT-PCR à l'aide d'amorces sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 31 à 43.

Le polynucléotide selon l'invention peut permettre de diagnostiquer un état pathologique ou une maladie génétique impliquant un dysfonctionnement du gène *asap* et de cribler des substances capables de moduler (activer ou inhiber) la transcription dudit gène.

5 L'invention a aussi pour objet les polynucléotides susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide des amorces selon l'invention.

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir
10 un signal délectable et/ou quantifiable.

Le marquage des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^3H ou l' ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la
15 biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémo-luminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en œuvre
20 notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (U.S. N° 4,683,202). D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplifica-
25 tion) ou technique d'amplification à déplacement de brin, la technique TAS (Transcription-based Amplification System), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction), la technique de RCR (Repair Chain
30 Reaction), la technique CPR (Cycling Probe Reaction), la technique d'amplification à la Q- β -réplicase. On peut encore citer la PCR-SSCP qui permet de détecter des mutations ponctuelles.

Ces techniques sont bien entendu parfaitement connues de l'homme du métier.

Comme sondes ou comme amorces, les différents polynucléotides selon l'Invention peuvent permettre, soit de déterminer le profil de transcription du gène *asap* correspondant ou une éventuelle altération de ce profil dans un échantillon biologique, soit de mettre en évidence le gène correspondant dans d'autres espèces, des variants alléliques de ce gène ou une éventuelle altération fonctionnelle de ce gène (changement substantiel dans l'activité de la protéine codée par ledit gène) résultant d'une mutation (insertion, délétion ou substitution) d'un ou plusieurs nucléotides au niveau d'au moins un exon dudit gène. De telles mutations incluent en particulier les délétions, les insertions ou les substitutions non-conservatives au niveau de codons correspondant à des résidus d'acides aminés situés dans un domaine essentiel pour l'activité biologique de la protéine.

Ainsi l'Invention a pour objet une méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'Invention ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde selon l'Invention, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Par conditions classiques d'hybridation, on entend celles décrites dans Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape de transcription inverse et d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

Ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène peut en outre comporter une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison avec un échantillon témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique présentant une transcription normale ou altérée du gène correspondant au

polynucléotide selon l'invention auquel ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène est appliquée dans les mêmes conditions.

L'invention a aussi pour objet une méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide
 5 selon l'invention ou des variants alléliques dudit gène ou d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir des cellules d'un échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact
 10 desdits ADN avec une sonde selon l'invention, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une
 15 paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés. La méthode peut éventuellement comporter une quatrième étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

L'invention a également pour objet une trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes précédemment décrites comprenant :

20 a) au moins une sonde ou une paire d'amorces selon l'invention ;

b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde ou lesdites amorces et l'acide
 25 nucléique de l'échantillon biologique ;

c) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification ;

d) les réactifs nécessaires à la détection et/ou au dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon
 biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

30 Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs afin d'assurer la qualité des résultats obtenus. Elle peut également contenir les réactifs nécessaires à la purification des acides nucléiques à partir de l'échantillon biologique.

~~Le polynucléotide de l'invention ou un de ses fragment, ainsi que les EST~~

décrits précédemment ou leur fragments peuvent servir à la mise au point de modèles cellulaires ou animaux n'exprimant pas la protéine ASAP, en invalidant le gène *ASAP* par la méthode de Si RNA (ou RNAi pour RNA interference ; M. McManus and P. Sharp, Nature Reviews Genetics, 3, 737-747, 2002 ; V. Brondani, F. Kolb, E. Billy, M/S, 6-7, 665-667, 2002) à l'aide d'oligonucléotides dérivés de leurs séquences.

L'Invention a également pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré le polynucléotide selon l'invention.

Un tel vecteur peut contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion de la protéine dans une cellule hôte.

Lesdits vecteurs comportent de préférence : un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement comprendre des séquences codant pour des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite tels que par exemple un promoteur fort de nature ubiquitaire ou un promoteur sélectif d'un type de cellule et/ou de tissu particulier. Ces différentes séquences de contrôle sont choisies en fonction de l'hôte cellulaire utilisé.

Le polynucléotide selon l'invention peut être inséré dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral. Les vecteurs viraux peuvent notamment être des adénovirus, des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques. L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus ou les virus associés aux adénovirus (Adeno-associated virus ou AAV).

Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN ou l'ARN nu, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC,

bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les vecteurs recombinants en résultant peuvent être introduits dans l'hôte approprié par des méthodes standards, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'invention a aussi pour objet les cellules hôtes transformées, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'invention ou au moins un vecteur selon l'invention a été introduit.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les cellules bactériennes, les cellules de levure, les cellules animales, en particulier les cellules de mammifères ou encore les cellules végétales. On peut citer également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en oeuvre des baculovirus.

L'invention a également pour objet les organismes transgéniques tels que les animaux ou les végétaux transgéniques, dont tout ou partie des cellules contient le polynucléotide selon l'invention ou le vecteur selon l'invention, sous une forme libre ou intégrée.

De préférence selon l'invention, les organismes transgéniques sont ceux porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'invention, non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

Selon l'invention les animaux transgéniques sont de préférence des mammifères, excepté l'homme, plus préférentiellement les rongeurs, en particulier les souris ou les rats.

Les animaux transgéniques peuvent être obtenus par toute méthode classique connue de l'homme du métier, comme par exemple par

recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

5 Les cellules hôtes transformées, les animaux ou les végétaux transgéniques selon l'Invention peuvent ainsi exprimer ou surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'Invention ou leur gène homologue ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation.

10 Les cellules de testicule ou de cerveau, les cellules hôtes transformées ou les organismes transgéniques selon l'Invention peuvent être utilisés pour la préparation de la protéine selon l'Invention.

15 La protéine selon l'Invention, particulièrement la protéine ASAP native, peut être purifiée selon les techniques connues de l'homme du métier. Ainsi, la protéine peut être purifiée à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, particulièrement de chromatographie d'affinité, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

20 L'Invention a également pour objet une méthode de préparation de la protéine ASAP, se caractérisant en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la présente Invention, notamment les cellules de mammifères ou les cellules d'organismes transgéniques selon l'Invention, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

25 Comme technique de purification, on peut citer par exemple la chromatographie d'affinité sur glutathione-sépharose (ou agarose) telle que décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

30 L'Invention a également pour objet une protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par l'une quelconque des méthodes de préparation ci-dessus décrites.

L'Invention a encore pour objet une méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine selon l'invention et

5 - dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine selon l'invention.

La présente invention a également pour objet une méthode de criblage d'une substance capable de moduler (activer ou inhiber) l'activité de la protéine ASAP, caractérisée en ce que :

10 - dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine ASAP avec une substance à tester,

- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP, et

15 - dans une troisième étape on sélectionne des substances capables de moduler ladite activité.

Au sens de la présente invention, on entend par activité de la protéine ASAP, aussi bien l'expression de la protéine ASAP ou des transcrits (ARNm) correspondants, que l'activité biologique de ladite protéine ASAP, comme par exemple son effet sur l'organisation du fuseau mitotique ou
20 l'induction de mitoses aberrantes et abortives.

La détection du complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine ou la mesure de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP peuvent être réalisées par les techniques classiques d'analyse d'ARNm ou de protéines qui sont connues en
25 elles-mêmes ; à titre d'exemple non-limitatif, on peut citer les techniques suivantes : RT-PCR, Northern-blot, Western-blot, RIA, ELISA, immunoprécipitation, techniques d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique.

Avantageusement, ladite mesure est réalisée à l'aide des sondes, des amorces ou des anticorps, tels que définis ci-dessus.

30 De telles substances peuvent être des macromolécules biologiques comme par exemple un acide nucléique, un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre,

peptide-lipide ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques ou encore des molécules chimiques.

L'invention a également pour objet le polynucléotide, la protéine, les anticorps, les vecteurs ou les cellules transformées selon l'invention, utilisés comme médicaments.

Comme indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'invention bloque la division cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire. Cela en fait un excellent candidat pour une utilisation comme agent anti-mitotique, utilisable par exemple dans le traitement des pathologies cancéreuses.

Ainsi, l'invention a également pour objet l'utilisation du polynucléotide, d'un vecteur ou de la protéine selon l'invention, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

De même comme il est également indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires).

Ainsi, l'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un polynucléotide anti-sens ou d'un fragment anti-sens, d'un anticorps, d'un vecteur contenant un oligonucléotide anti-sens selon l'invention, capables d'inhiber l'expression du polynucléotide ou de la protéine selon l'invention, dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la structure du gène *asap* humain.

La Figure 2 représente les signaux obtenus par Northern blots sur différents tissus humains après hybridation avec une sonde hASAP.

La Figure 3 représente les résultats obtenus :

(A) par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR obtenus avec des amorces correspondant au polynucléotide de souris, orthologue du polynucléotide SEQ ID N°15, à partir de différents tissus de souris.

5 (B) Après transfert du gel après électrophorèse sur une membrane et hybridation avec une sonde mASAP interne.

La Figure 4 représente la localisation cellulaire de la protéine hASAP couplée à la Green Fluorescent Protein (GFP) en 3' ou la Yellow Fluorescent Protein (YFP) en 5' ou à un tag MYC du côté N-terminal (colonne
10 fusion).

Les noyaux sont colorés à l'iodure de propidium ou au Hoechst 33286. (4A : objectif 63x ; 4B, 4C, 4D : objectif 100X).

La Figure 5 montre la co-localisation de la protéine ASAP humaine avec l'alpha-tubuline. Figure 5 A : localisation cellulaire de l'alpha-tubuline, Figure 5 B : localisation de la protéine ASAP, Figure 5 C : superposition des 2 images montrant la colocalisation des 2 protéines.
15

Les exemples suivants sont illustratifs de l'invention et ne la limitent aucunement.

Exemple 1 : Construction de la séquence codante ASAP
20 **complète :**

On amplifie la séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP à partir de 2 fragments chevauchants :

∴ - un fragment A amplifié par PCR à partir du clone A1885274 avec les amorces :

25 constFIS-1F (5'-ATGTCTGATGAAGTTTTTAGCACC-3') (SEQ ID N° 31) et

constFIS-2R (5'-AGGCCTCAAATGATGCTAATGC-3') (SEQ ID N° 32) ;

- un fragment B amplifié à partir du clone A1671785 avec les
30 amorces :

constFIS-2F (5'-ATCATTTGAGGCCTGGAAGGC-3') (SEQ ID N° 33) et

et constFIS-1R (5'-AAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3')
(SEQ ID N° 34).

Puis, pour obtenir un produit PCR unique correspondant à la
séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP, utilisable pour les expé-
riences de fonction, 0,5 µl des produits de chacune des 2 réactions PCR
(fragment A et B) sont hybridés ensemble à 25°C puis amplifiés avec les
amorces constFIS-1F et constFIS-2F. Ce produit PCR est sous-cloné dans le
vecteur PCR4 suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen) et vérifié
par séquençage.

Les difficultés majeures rencontrées se sont situées dans la
détermination *in silico* de la séquence codante complète ASAP et de sa
reconstruction *in vitro*. En particulier, le choix des amorces et des différentes
PCR de la région 3' ont été délicats en raison de la richesse de la séquence
en polydA.

Exemple 2 : Analyse bio-informatique

La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la
structure du gène *asap* humain.

L'organisation complète du gène *asap* et sa localisation
chromosomique ont été obtenues en comparant la séquence de l'ADNc
obtenu à l'exemple 1, à la séquence du génome humain en utilisant les
programmes du Wellcome Trust Sanger Institute
(<http://www.ensembl.org/genome/central/>) et plus précisément le programme
de recherche BLAST (<http://genome.cse.ucsc.edu/>).

Le gène humain *asap* est constitué de 29750 nucléotides
comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant
pas traduit. La taille des exons s'échelonne de 71 à 321 paires de bases. La
séquence du gène est contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204
paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3
NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), et est par ailleurs
localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053
et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb). La séquence du
gène est physiquement contenue dans le clone BAC RP11-27G13.

Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du
polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de

données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et n'ont jamais été ni reconnues ni caractérisées.

La séquence protéique a été comparée aux séquences des banques de données en utilisant les programmes PSI-BLAST et PHI-BLAST du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/>). Des motifs protéiques consensus ont été recherchés en utilisant les programmes DART du NCBI et SMART d'ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/#similarw>), dont les paramètres permettent de détecter des motifs de faible homologie. La protéine ASAP présente une identité de séquence de 23% sur le tiers C-terminal avec une protéine associée aux microtubules (MAP 1A pour Microtubule-Associated-Protein 1A). Par ailleurs la recherche de motifs conservés (DART on SMART) révèle des domaines de type caldesmon (Gusev, N.B., Biochemistry, 10 1112-1121, 2000) et ERM (Ezrin/radixin/moesin) (Louvet-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), qui sont des protéines également considérées comme des MAPs, avec des identités d'environ 20%. Elle présente également un domaine BRCT (Breast cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., FASEB J.,

11, 68-76 (1997)) entre les positions 65 et 303.

La protéine ASAP présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine s'oligomériser, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines.

L'analyse informatique de la protéine à l'aide des programmes accessibles dans le site internet (http://npsa-bil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_secons.html), révèle l'absence de feuillet β et une très grande richesse en hélices α , en particulier pour la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formées d'hélices α .

Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

Exemple 3 : Expression tissulaire

a) Analyse par Northern blot :

Préparation des sondes radioactives :

Les ADN à radiomarquer sont isolés sur gel à bas point de fusion (LMP) selon la technique décrite dans Rouquier, S. et al., (Genomics, 17, 330-340, (1993)). Environ 100 ng d'ADN ainsi isolé, sont marqués par amorçage aléatoire (fragment de Klenow, Proméga) en présence de [α - 32 P dCTP] (Amersham) selon la technique décrite dans Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., (Anal. Biochem., 132, 6-13, (1983)). Ces sondes sont purifiées sur des colonnes de Sephadex G-50 selon la technique décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Les hybridations s'effectuent durant la nuit en présence de $2 \cdot 10^6$ Cpm/ml de sonde radioactive dénaturée.

a.1) Hybridation :

Deux membranes Northern Blot de la société Clontech, (Human MTN Blot at Human MTN Blot II, Réf. 7760-1 et 7759-1) comportant des ARNm humains de différents tissus ont été hybridées avec l'ADNc hASAP complet marqué comme décrit ci-dessus. La membrane est hybridée en présence de formamide à 42°C, en suivant le protocole Clontech. Un contrôle d'hybridation de la membrane est réalisé avec une sonde actine. La membrane est rincée 2 fois à haute stringence en 0,1X SSC/0,1% SDS à la

température de 42°C, pendant 15 minutes. Les membranes sont alors analysées par autoradiographie ou au PhosphorImager.

Les tissus testés sont : la rate, le thymus, la prostate, le testicule, l'ovaire, l'intestin grêle, le colon, les leucocytes sanguins, le cœur, le
 5 cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle squelettique, le rein et le pancréas.

a.2) Résultats :

La Figure 2 représente ces résultats.

Deux signaux sont détectés :

- 10 - un signal dans le testicule à environ 2,6 kb, ce qui correspond à la taille de l'ARNm ;
- un signal dans le cerveau mais à un haut poids moléculaire (9 kb) qui correspond soit à un pré-messager, soit à une isoforme de haut poids moléculaire

15 b) Analyse par RT-PCR :

Cette analyse a été effectuée sur des ARNs totaux de différents tissus de souris, à savoir le cerveau, le cœur, le colon, le foie, l'intestin grêle, le muscle squelettique, le pancréas, le poumon, le rein, la rate et le testicule.

20 b.1) Obtention de l'ADNc orthologue de souris :

Les ARNs totaux de cellules de différents tissus de souris sont extraits avec le "mammalian total RNA kit" de la société Sigma. Les ARN sont rétro-transcrits avec le kit Superscript II de la société Invitrogen selon les conditions prescrites par le fournisseur et en utilisant des amorces oligodT.
 25 Les produits obtenus sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. 1 µl de chaque échantillon ainsi obtenu est à son tour amplifié par PCR (25 µl de milieu de réaction, 30 cycles (94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 30 secondes)) avec des amorces spécifiques du gène *asap* de souris (mFIS-1F, 5'-ACA ACG AAT AAC AGA GTG TCC-3' (SEQ ID N° : 35) et mFIS-2R, 5'-ACT CCT GAT AAA CAG CTG CC-3' (SEQ
 30 ID N° : 36).

Les produits amplifiés obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, colorés au bromure d'éthidium et leur taille comparée à un marqueur de taille déposé sur le gel en parallèle.

Après électrophorèse, les produits amplifiés obtenus sont transférés par capillarité sur membrane de nylon chargée, dans le tampon NaCl 1,5M/NaOH 0,5M, selon la technique de Southern (transfert alcalin). La membrane est ensuite hybridée avec une sonde radiomarquée mASAP, (SEQ ID N°44), générée par amplification de la séquence contenue dans le clone de souris AW06131 sélectionné après comparaison de la séquence ASAP humaine dans les banques de données (GenBank) (http://expression.gnf.org/promoter/tissue/images/41739_s_at.png).

L'amplification a été réalisée par PCR (conditions telles que décrites ci-dessus dans lesquelles le volume de réaction est de 50 µl et le dCTP froid est à la concentration de 10 µM supplémenté avec 50 µCi d' α - P^{32} -dCTP à 3000Ci/mmmole), en utilisant les amorces mFIS-1F (SEQ ID N° : 35) et mFis-2R (SEQ ID N° : 36). Les hybridations sont réalisées à 65°C (dans du tampon 6X SSC/0,5% SDS/5X Denhardt). La membrane est rincée à forte stringence (0,1X SSC/0.1% SDS), puis analysée par autoradiographie ou au PhosphorImager.

b.2) Résultats :

La Figure 3 représente ces résultats.

On constate qu'on obtient un signal majoritaire dans le testicule et le cerveau nettement visible sur gel (Figure 3A).

Après transfert du gel et hybridation avec une sonde interne, on constate que l'on détecte un signal très faible dans les autres tissus (Figure 3B).

Par conséquent l'ARNm codant pour la protéine mASAP est majoritairement exprimé dans le testicule et le cerveau.

Exemple 4 : Localisation cellulaire

a) Sous-clonage de l'ADNc hASAP dans un vecteur d'expression eucaryote :

L'ADNc hASAP obtenu à l'exemple 1 est inséré dans trois vecteurs d'expression :

1- dans pEAK10-EGFP en phase avec la Green Fluorescent Protein (GFP) fusionnée en C-terminal (vecteur 1) (pEAK10, vecteur de Edge Biosystems (distribué par Q.BIOgene, Illkirch en France) dans lequel a été introduit la protéine EGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) suivant la
5 référence Gaillard, I., et al., Eur. J. Neurosci., 15, 409-418, 2002) ;

2- dans pEYFP-C1 en phase avec la Yellow Fluorescent Protein (YFP) fusionnée du côté N-terminal (vecteur 2) (distribué par BD Biosciences Clontech)) ;

3- dans GLOMYC3-1 comportant un tag MYC du côté
10 N-terminal (vecteur 3), vecteur dérivé du vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen), dans lequel ont été insérées une région 5' non-traduite (5' UTR) et un tag MYC aux sites *HindIII-BamHI*, et la région 3'UTR de la globine (fragment *SpeI-XbaI* dans le site *XbaI*).

L'ADNc hASAP est amplifié à partir de son vecteur de clonage
15 initial (pCR4-TOPO) par PCR en utilisant la polymérase haute-fidélité pfu Turbo, à l'aide d'amorces amplifiant l'ADNc entre la méthionine de départ et le dernier acide aminé. Les produits amplifiés obtenus sont sous-clonés dans les 3 vecteurs.

- Clonage dans PEAK-GFP. Préparation de l'insert d'ADN
20 par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 58°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30 cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces

hFIS-Exp1F (5'-GCCACCATGTCTGATGAAGTTTTTAGCAC-3) (SEQ ID N° : 37) et

hFIS-Exp1R (5'-GAAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID N° : 38).

25 Le vecteur est coupé par *EcoRV* et déphosphorylé : 10 ng de vecteur sont utilisés pour la ligation avec l'insert d'ADN. Le produit PCR est phosphorylé puis purifié sur high PURE PCR kit (Roche) : 100 ng d'insert sont utilisés pour la ligation [12h à 16°C dans 10 µl final (ligase Biolabs), suivant les conditions standards (Sambrook and Russell)].

30 - Clonage dans Glomyc : Préparation de l'insert d'ADN par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 60°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30

cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces :

Glomyc-FIS1F : (5'-TAATGTCTGATGAAGTTTTAGCACC-3') (SEQ ID N° : 39) et

5 Glomyc-FIS1R : (5'-TCAAAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID N° : 40).

Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le clonage dans PEAK-GFP.

- Clonage dans YFP : Préparation de l'insert d'ADN : mêmes conditions que pour Glomyc, à l'aide des amorces :

10 YFP-FIS1F (5'-AATGTCTGATGAAGTTTTAGCACC-3') (SEQ ID N° : 41) et Glomyc-FIS1R (SEQ ID N° : 40) (cf ci-dessus).

Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le clonage dans PEAK-GFP, le vecteur ayant préalablement été coupé par *Sma*1.

15 Les recombinants sont analysés par PCR en utilisant une amorce du vecteur et une amorce interne.

PEAK-GFP : annealing à 58°C, extension 45 sec. à 72°C. et conditions standards pour le reste. Amorces : constFIS-2F (SEQ ID N° : 33) et GFP-1R (5'-TCAGCTTGCCGTAGGTGGC-3') (SEQ ID N° : 42).

20 YFP : annealing 55°C pendant 1 min. ; Amorces : YFP-2F (5'-ATGGTCCTGCTGGAGTTCG-3') (SEQ ID N° : 43) et hFIS-Exp1R (SEQ ID N° : 38).

25 Glomyc : annealing 44°C, extension 45 sec. à 72°C. Amorces : constFIS-2F (SEQ ID N° : 33) et SP6. Les recombinants sont séquencés par séquençage automatique à façon à partir des produits PCR (Genome Express, Meylan).

b) Transfection, immunofluorescence et microscopie :

Les vecteurs obtenus sont transfectés selon la technique au phosphate de calcium ou de façon plus routinière en utilisant le procédé jetPEI (GDSP10101, Qbiogene) suivant les recommandations du fabricant,

dans les lignées cellulaires PEAK (ref. 37937, Edge Biosystems (distribué par Q-BIOgene, Illkirch en France)) ou HEK-293 (ATCC (Américan Tissue Culture Collection) référence CRL-1573).

Pour les vecteurs 1) et 2), les localisations se font directement par détection de la fluorescence de la GFP ou de l'YFP à 24h, 48h et 72h après fixation des cellules au paraformaldéhyde et coloration des noyaux soit au propioiodure de propidium, soit au Hoechst 33286.

Pour le vecteur 3) la détection du tag MYC est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-MYC distribué par TEBU (9 E10, cat.#SC-40, Santa Cruz Biotechnology, CA) et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris marqué au fluorochrome Alexa-594 (Molecular Probes, ref. A-11032, distribué en France par Interchim, Montluçon), après la fixation des cellules et leur perméabilisation au Triton X100 0,1%. Les lames sont analysées, et les images collectées sur un microscope Zeiss Axiophot.

b) Résultats : Localisation cellulaire

La Figure 4 représente ces résultats (IP = Iodure de propidium).

L'observation au microscope à fluorescence des lames correspondant aux différentes transfections par les vecteurs 1), 2) et 3) montrent les mêmes types de profil : la localisation de la protéine hASAP est cytoplasmique et son profil fibreux rappelle celui des filaments de tubuline.

Par ailleurs, il semble que les cellules transfectées présentent des défauts de division car les noyaux sont toujours plus gros que dans les cellules non transfectées (Figure 4A et 4B). De plus, certaines des cellules transfectées semblent plurinucléées (Figure 4B). Ceci suggère une division des cellules transfectées anormale.

Enfin, la mitose des cellules transfectées semble anormale, tant au niveau de l'organisation des chromosomes, que du profil de localisation de la protéine hASAP au niveau du fuseau mitotique. Le profil de localisation de la protéine hASAP en étoile, est caractéristique de la nucléation des microtubules en aster autour du centrosome (Figures 4C et 4D).

La Figure 5 montre la co-localisation de la protéine ASAP

humaine avec l'alpha-tubuline.

La Figure 5 A montre la localisation cellulaire de l'alpha-tubuline détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-tubuline (Alexa-594, Molecular Probe).

5

La Figure 5 B montre la localisation de la protéine ASAP marquée à la YFP (yellow fluorescent protein):

La Figure 5 C montre la superposition des 2 images montrant la colocalisation des 2 protéines.

REVENDEICATIONS

1) Protéine isolée, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

5 a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°1 ;

b) une protéine comportant, sur sa totalité, au moins 80% d'identité ou au moins 90% similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou moins 95% similarité, avec la protéine de séquence SEQ ID N°1.

10 2) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine selon la revendication 1.

3) Peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste de séquence en annexe sous les numéros SEQ ID N°2 à SEQ ID N°14.

15 4) Protéine variante de la séquence SEQ ID N°1, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation entraînant un dysfonctionnement de la protéine.

20 5) Protéine ou peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 4, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine ou d'un peptide d'origine humaine.

6) Polynucléotide isolé, comprenant ou répondant à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les polynucléotides codant pour une protéine ou pour un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ;

25 - un polynucléotide répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°15 ;

- le fragment d'ADN génomique de 29800 nucléotides répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°16, correspondant au gène *asap* humain ;

30 - un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de l'un quelconque des polynucléotides précédents, à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et des EST répertoriés sous numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449,

REVENDEICATIONS

1) Protéine isolée, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

5 a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°1 ;

b) une protéine comportant, sur sa totalité, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou moins 95% de similarité, avec la protéine de séquence SEQ ID N°1.

10 2) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine selon la revendication 1.

3) Peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID N°2 à SEQ ID N°14.

15 4) Protéine variante de la séquence SEQ ID N°1, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation entraînant un dysfonctionnement de la protéine.

5) Protéine ou peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 4, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine ou d'un peptide d'origine humaine.

6) Polynucléotide isolé, comprenant ou répondant à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les polynucléotides codant pour une protéine ou pour un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ;

25 - un polynucléotide répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°15 ;

- le fragment d'ADN génomique de 29800 nucléotides répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N°16, correspondant au gène *asap* humain ;

30 - un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de l'un quelconque des polynucléotides précédents, à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et des EST

BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679,
 BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877,
 AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090,
 BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134,
 5 AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236,
 BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415,
 BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311,
 BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248,
 BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007,
 10 BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835,
 AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224,
 BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238,
 BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381,
 BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509,
 15 BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567,
 AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835,
 AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de
 données GenBank ;

- un fragment de l'un quelconque des polynucléotides
 20 précédents, sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste des
 séquences en annexe sous les numéros SEQ ID N°16 à SEQ ID N°30 ;

- un polynucléotide présentant un pourcentage d'identité
 d'au moins 80 %, de préférence 90 %, après alignement optimal avec l'un des
 polynucléotides ou l'un des fragments précédents ;

25 - les polynucléotides complémentaires des précédents, sens
 ou anti-sens.

7) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 6,
 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide variant de la séquence SEQ
 ID N°15.

30 8) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 7,
 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide porteur d'au moins une muta-
 tion conduisant à une modification de la séquence en acides aminés de la
 protéine correspondant à la séquence SEQ ID N°1.

9) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment selon
 35 l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou de l'une des séquences répertoriées

- répertoriés sous numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130,
- 5 BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152,
- 10 BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277,
- 15 AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ;
- 20 - un fragment de l'un quelconque des polynucléotides précédents, sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste des séquences en annexe sous les numéros SEQ ID N°16 à SEQ ID N°30 ;
- un polynucléotide présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, après alignement optimal avec l'un des
- 25 polynucléotides ou l'un des fragments précédents ;
- les polynucléotides complémentaires des précédents, sens ou anti-sens.
- 7) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide variant de la séquence SEQ
- 30 ID N°15.
- 8) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide porteur d'au moins une

riées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et d'un des EST
 répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449,
 BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679,
 BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877,
 5 AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090,
 BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134,
 AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236,
 BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415,
 BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311,
 10 BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248,
 BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007,
 BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835,
 AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224,
 BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238,
 15 BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381,
 BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509,
 BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567,
 AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835,
 AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de
 20 données GenBank ou de leurs fragments, comme sonde pour détecter, identi-
 fier ou doser des polynucléotides correspondants au polynucléotide selon
 l'une quelconque des revendications 6 à 8, particulièrement dans d'autres
 organismes.

10) Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que
 25 la sonde est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID
 N°15 ou SEQ ID N° 17 à SEQ ID N° 44.

11) Amorce pour l'amplification des polynucléotides (ARN ou
 ADN génomique) correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque
 des revendications 6 à 8, particulièrement dans d'autres organismes caracté-
 30 risée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les
 séquences SEQ ID N° 31 à 43.

12) Polynucléotide susceptible d'être obtenu par amplification
 à l'aide des amorces selon la revendication 11.

13) Méthode de détermination du profil de transcription du
 35 gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendica-

mutation conduisant à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondant à la séquence SEQ ID N°1.

9) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou de l'une des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et d'un des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou de leurs fragments, comme sonde pour détecter, identifier ou doser des polynucléotides correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, particulièrement dans d'autres organismes.

10) Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la sonde est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N°15 ou SEQ ID N° 17 à SEQ ID N° 44.

11) Amorce pour l'amplification des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque

tions 6 à 8 ou 12, ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10 préalablement marquée dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

14) Méthode selon la revendication 13, dans laquelle la deuxième étape est une étape de transcription inverse et/ou d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 11 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés.

15) Méthode selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement choisi.

16) Méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12, ou de mise en évidence des variants alléliques dudit gène ou de mise en évidence d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

17) Méthode selon la revendication 16, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendications 11 et la troisième étape une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

18) Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

19) Trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes selon l'une quelconque des revendications 13 à 18 comprenant:

des revendications 6 à 8, particulièrement dans d'autres organismes caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 31 à 43.

12) Polynucléotide susceptible d'être obtenu par amplification
5 à l'aide des amorces selon la revendication 11.

13) Méthode de détermination du profil de transcription du
gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des
revendications 6 à 8 ou 12, ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon
biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen
10 approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième
étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde telle que définie aux
revendications 9 ou 10, préalablement marquée, dans des conditions
classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de
révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

14) Méthode selon la revendication 13, dans laquelle la
15 deuxième étape est une étape de transcription inverse et/ou d'amplification
des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication
11 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié
des acides nucléiques amplifiés.

15) Méthode selon l'une quelconque des revendications 13 ou
20 14, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du
taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement
choisi.

16) Méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du
25 gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des
revendications 6 à 8 ou 12, ou de mise en évidence des variants alléliques
dudit gène ou de mise en évidence d'une altération fonctionnelle de ce gène,
dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention
par tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une
30 deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde telle que
définie aux revendications 9 ou 10, préalablement marquée, dans des

- au moins une sonde selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10 et/ou une paire d'amorces selon la revendication 11 ;

- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification ;

- les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

20) Vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12.

21) Cellules hôtes transformées, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou au moins un vecteur selon la revendication 20 a été introduit.

22) Organismes transgéniques, dont tout ou partie des cellules contient au moins un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou au moins un vecteur selon la revendication 21, sous une forme libre ou intégrée.

23) Organismes transgéniques selon la revendication 22 caractérisés en ce qu'ils sont porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

24) Utilisation d'une cellule transformée selon la revendication 21 ou d'un organisme transgénique selon l'une quelconque des revendications 22 ou 23, pour la production d'une protéine ou d'un peptide décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

25) Méthode de préparation d'une protéine ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la revendication 21 ou un organisme transgénique selon l'une quelconque des revendications 22 ou 23, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

17) Méthode selon la revendication 16, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 11 et la troisième étape une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

18) Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

19) Trousse de réactifs pour la mise en oeuvre des méthodes selon l'une quelconque des revendications 13 à 18 comprenant :

- au moins une sonde telle que définie aux revendications 9 ou 10 et/ou une paire d'amorces selon la revendication 11 ;
- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification ;
- les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

20) Vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12.

21) Cellules hôtes transformées, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou au moins un vecteur selon la revendication 20 a été introduit.

22) Organismes transgéniques non-humains, dont tout ou partie des cellules contient au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou au moins un vecteur selon la revendication 20, sous une forme libre ou intégrée.

26) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par la méthode de préparation selon la revendication 25.

27) Anticorps mono- ou polyclonal caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement une protéine ou un peptide selon l'une
5 quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

28) Anticorps selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il reconnaît, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID N°1.

29) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des
10 revendications 27 ou 28 pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

30) Méthode de détection d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26, dans les cellules d'un échantillon biologique, comprenant

15 - une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,

- une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 et
20

- une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

31) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 pour la détection et/ou la sélection de cellules
25 présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

32) Méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité de cellules cancéreuses comprenant
30

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,

23) Organismes transgéniques non-humains selon la revendication 22, caractérisés en ce qu'ils sont porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 non fonctionnel ou porteurs d'une mutation.

5 24) Utilisation d'une cellule transformée selon la revendication 21 ou d'un organisme transgénique non-humain selon l'une quelconque des revendications 22 ou 23, pour la production d'une protéine ou d'un peptide décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

10 25) Méthode de préparation d'une protéine ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la revendication 21 ou un organisme transgénique non-humain selon l'une quelconque des revendications 22 ou 23, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

15 26) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par la méthode de préparation selon la revendication 25..

27) Anticorps mono- ou polyclonal caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement une protéine ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

20 28) Anticorps selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il reconnaît, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID N°1.

25 29) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

30 30) Méthode de détection d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26, dans les cellules d'un échantillon biologique, comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,

- une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28,

5 - une troisième étape de mise en évidence et de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et

- une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi.

10 33) Trousse permettant de mettre en oeuvre la méthode selon l'une quelconque des revendications 30 ou 32 comprenant :

- au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ;

- les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

15 34) Méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou la protéine ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26, caractérisée en ce que :

20 - dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine et

- dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine.

25 35) Méthode de criblage d'une substance capable de moduler (activer ou inhiber) l'activité de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26, avec une substance à tester,

30 - dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine, et

- dans une troisième étape on sélectionne des substances capables de moduler ladite activité.

- une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 et

- une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

31) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 pour la détection et/ou la sélection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

32) Méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité de cellules cancéreuses comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,

- une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28,

- une troisième étape de mise en évidence et de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et

- une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi.

33) Trousse permettant de mettre en oeuvre la méthode selon l'une quelconque des revendications 30 ou 32 comprenant :

- au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ;

- les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

34) Méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide selon l'une

36) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26 ou polynucléotide ou fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ou vecteur selon la revendication 20 ou cellule transformée selon la revendication 21, utilisé comme médicaments.

37) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26 ou d'un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ou d'un vecteur selon la revendication 20 ou d'une cellule transformée selon la revendication 21, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

38) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment anti-sens selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ou d'un vecteur contenant un oligonucléotide anti-sens selon la revendication 20 et capable d'inhiber l'expression du polynucléotide ou de la protéine selon l'invention, dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou la protéine ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine et

5 - dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine.

35) Méthode de criblage d'une substance capable de moduler (activer ou inhiber) l'activité de la protéine selon l'une quelconque des 10 revendications 1 à 5 ou 26, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26, avec une substance à tester,

- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen 15 approprié de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine, et

- dans une troisième étape on sélectionne des substances capables de moduler ladite activité.

36) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26 ou polynucléotide ou fragment selon l'une quelconque des 20 revendications 6 à 8 ou 12 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ou vecteur selon la revendication 20 ou cellule transformée selon la revendication 21, utilisé comme médicaments.

37) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26 ou d'un polynucléotide ou d'un fragment selon 25 l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ou d'un vecteur selon la revendication 20 ou d'une cellule transformée selon la revendication 21, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

38) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment anti-sens 30 selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou 12 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28 ou d'un vecteur contenant un oligonucléotide anti-sens selon la revendication 20 et capable

d'inhiber l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1, 4 ou 5, dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 26.

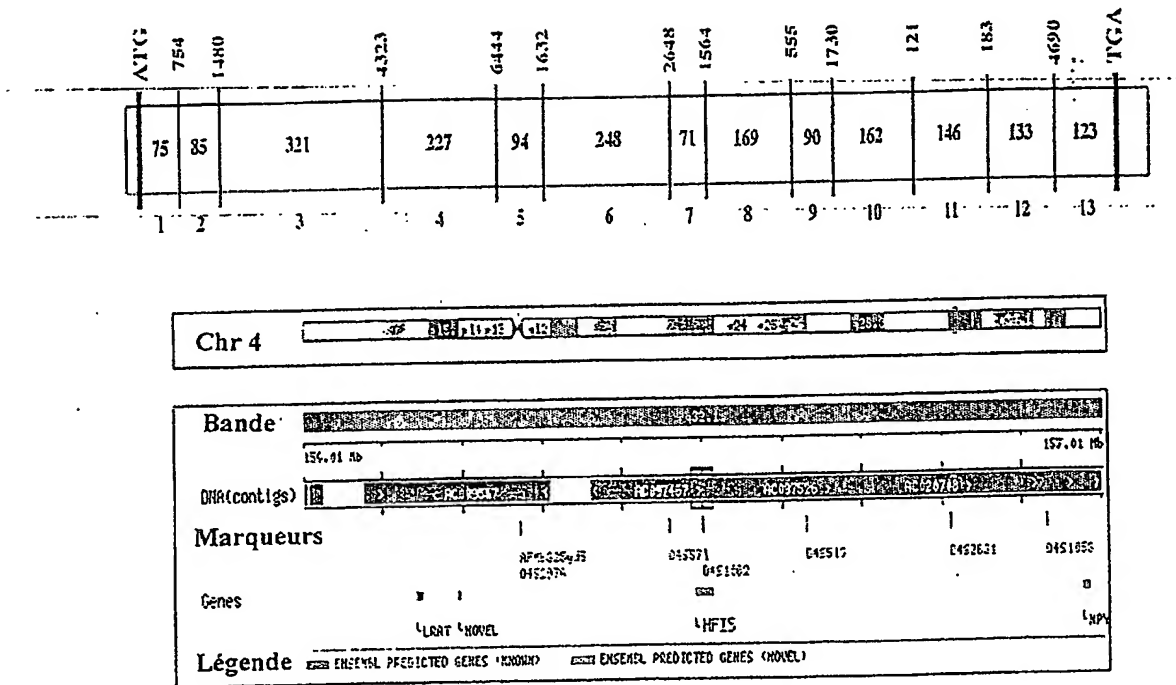


FIGURE 1

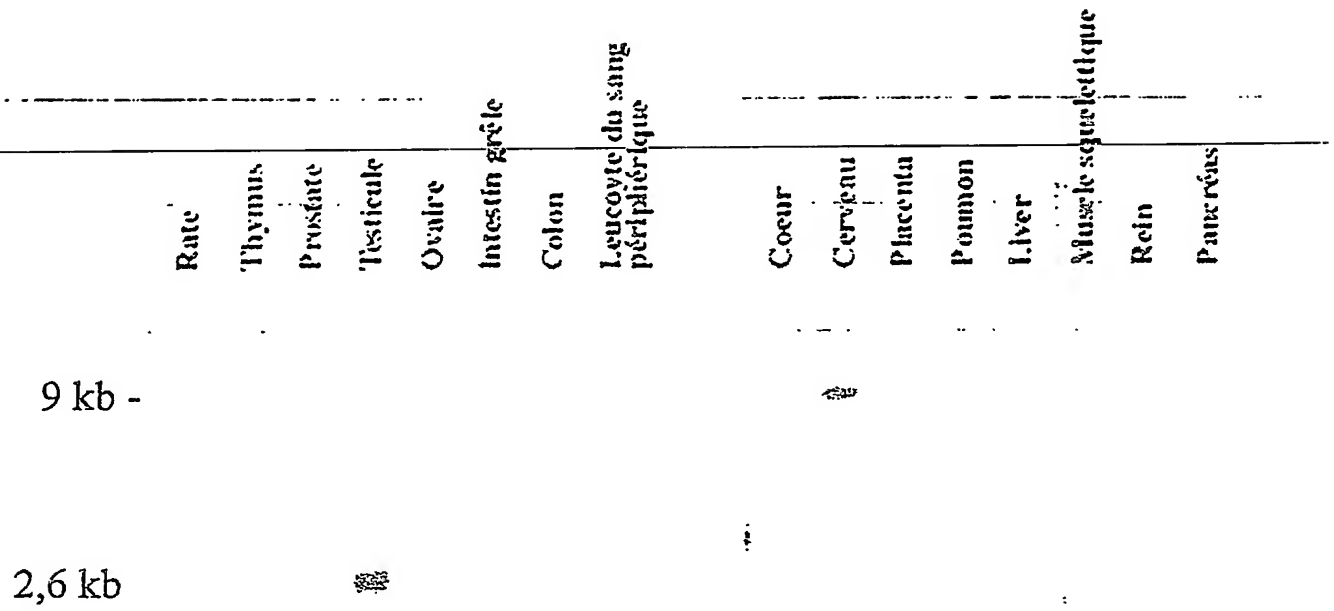


FIGURE 2

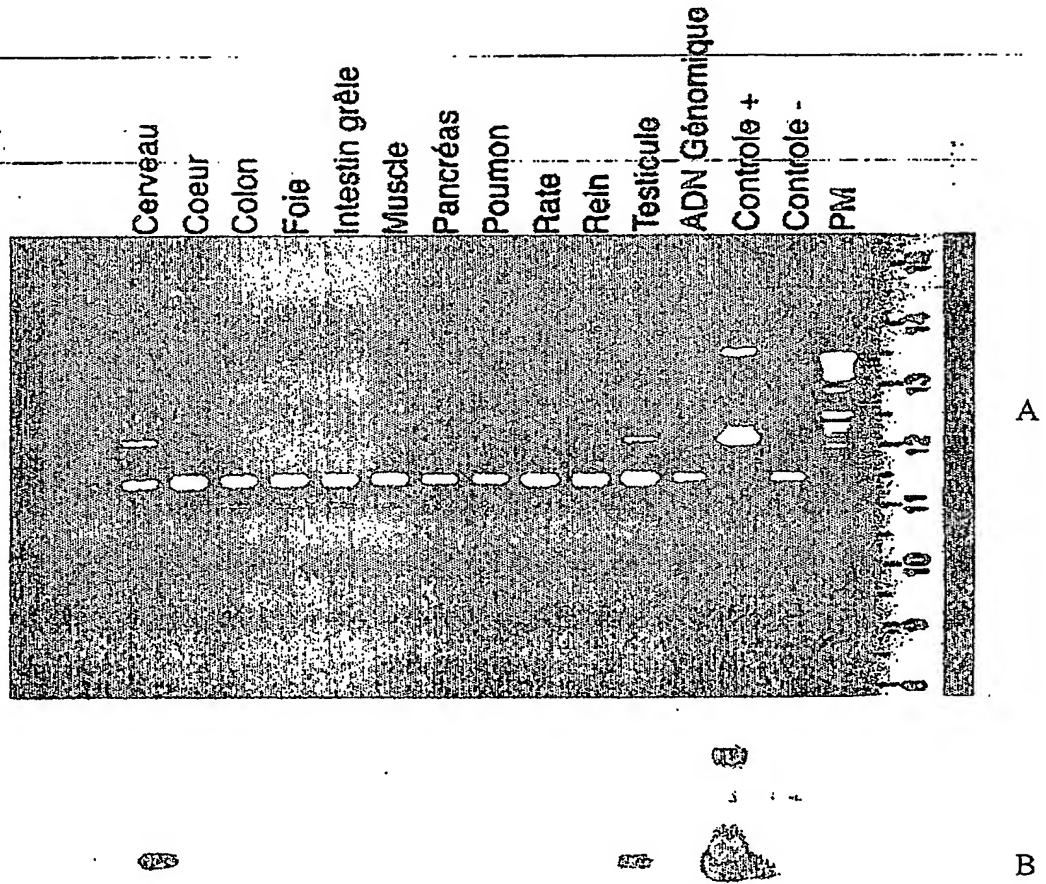


FIGURE 3

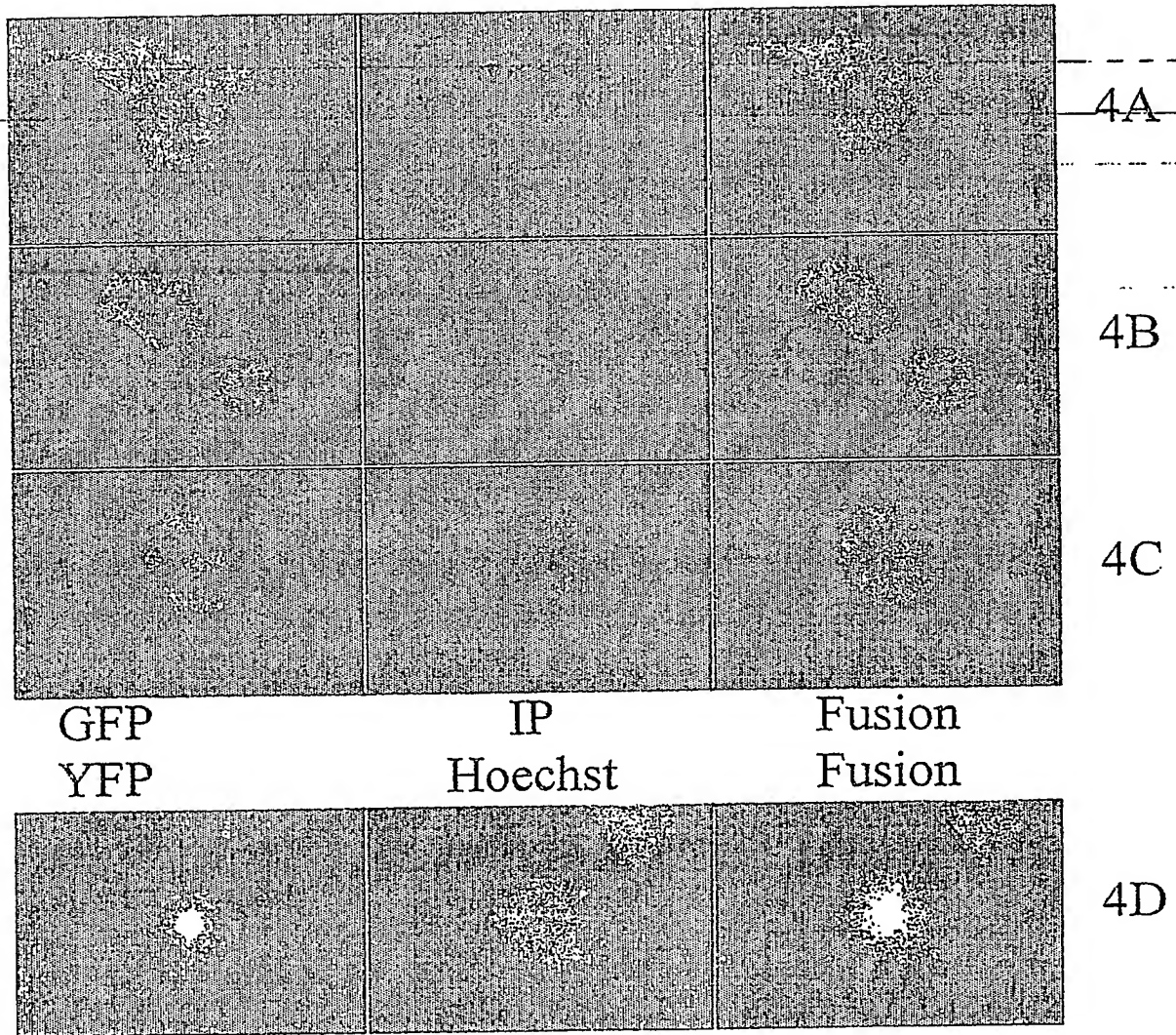
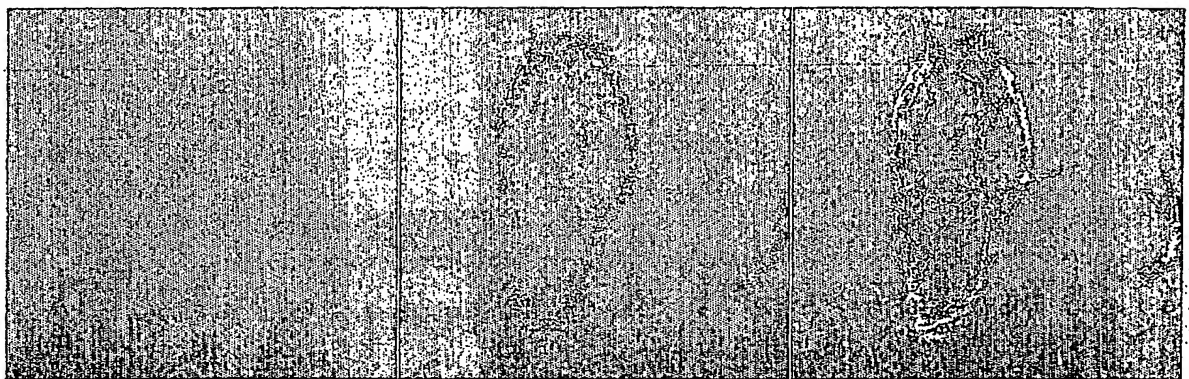


FIGURE 4



A

B

C

FIGURE 5

F644-88.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> Nouvelle protéine associée aux centrosomes et ses applications

<130> CGAF644s88

<160> 44

<170> PatentIn version 3.1..

<210> 1

<211> 647

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile
20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe
35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala
50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp
65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys
85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn
100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser
115 120 125

F644-88.ST25

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile
130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser
145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro
165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp
180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His
195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala
210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu
225 230 235 240

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe
245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu
260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn
275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu
290 295 300

Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu
305 310 315 320

Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser
325 330 335

Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr
340 345 350

Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala
355 360 365

Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser
370 375 380

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu
385 390 395 400

F644-88.ST25

Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile
405 410 415

Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp
420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg
435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala
450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys
465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys
485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys Gly Glu Ala
500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys
515 520 525

Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys
530 535 540

Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val
545 550 555 560

Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys Lys
565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys
580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu
595 600 605

Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His
610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg
625 630 635 640

Thr Val Phe Ala Lys Val Phe
645

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
 1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln
 20 25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser
 1 5 10 15

Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe Asp Ser Asp Glu Ile
 20 25

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala Asp Glu Asn Ser Val
 1 5 10 15

Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp Asp Glu Glu Lys Asn
 20 25 30

Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys Ser Asn Gly Asn Ile
 35 40 45

Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn Glu Glu Glu Met Ala
 50 55 60

Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser Phe Ser Glu Ser Gln
 65 70 75 80



F644-88.ST25

Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile Lys Met Lys Pro Lys
85 90 95

Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser
100 105

<210> 5

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro
1 5 10 15

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp
20 25 30

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His
35 40 45

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala
50 55 60

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu
65 70 75

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ser Cys Leu Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu
1 5 10 15

Gly Asp Ser Phe Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys
20 25 30

<210> 7

<211> 83

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Pro Asn Glu Glu Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp
 1 5 10 15

Glu Asn Lys Glu Asn Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val
 20 25 30

Glu Lys Ser Lys Glu Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu
 35 40 45

Lys Ala Lys Ala Glu Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro
 50 55 60

Leu Leu Ser Lys Ser Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala
 65 70 75 80

Ser Ser Lys

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Thr Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Ser Ala Ser Ala Arg
 20

<210> 9

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser Ser Ser Lys Arg Arg Thr
 1 5 10 15

Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu Gly Thr Leu Lys Val Leu
 20 25 30

F644-88.ST25

Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp
35 40 45

Asn Ile Arg Ala Ala Val
50

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His
1 5 10 15

Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln
20 25 30

<210> 11

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp
1 5 10 15

Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg
20 25 30

Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg
35 40 45

Lys Gly Glu Ala Leu Gln
50

<210> 12

<211> 49

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

F644-88.ST25

Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys Glu Lys
1 5 10 15

Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu
20 25 30

Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val Glu Lys
35 40 45

Trp

<210> 13

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys Lys Glu Lys Ile
1 5 10 15

Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys
20 25 30

Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp
35 40

<210> 14

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys
1 5 10 15

Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro
20 25 30

Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe
35 40

<210> 15

<211> 2575

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15
 acttccttcg tctgggtggt tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta 60
 cccgagagac ccggcggtgg ggaagtcact tcctcccgaa gacgctgttt cctagcaacc 120
 gccctccgcc tctgttatta gccctcctc ctgctcggt ccaggaccgg ctctgcgggc 180
 gccgccaggc ccagaccaag ctactatcag aagttgaatt ctaataatta gctattttat 240
 aaaggtaacg agaaaaaata cactatgtct gatgaagttt ttagcaccac tttggcatat 300
 acaagagtc caaaagttac caaaagaact actttccagg atgagctaatt aagagcaatt 360

acagctcgct cagccagaca aaggagttct gaatactcag atgactttga cagtgatgag 420
 attgtttctt taggtgattt ttctgacact tcagcagatg aaaattcagt taataaaaaa 480
 atgaatgact ttcatatatc agatgatgaa gaaaagaatc cttcaaaact attgtttttg 540
 aaaaccaata aatcaaacgg taacataacc aaagatgagc cagtgtgtgc catcaaaaat 600
 gaagaggaaa tggcacctga tgggtgtgaa gacattgttg taaaatcttt ctctgaatct 660
 caaaataagg atgaggaatt tgaaaaagac aaaataaaaa tgaaacctaa acccagaatt 720
 ctttcaatta aaagcacatc ttcagcagaa aacaacagcc ttgacacaga tgatcacttt 780
 aaaccatcac cttggccaag gagtatgtta aaaaagaaaa gtcacatgga ggagaaggat 840
 ggactagaag ataaagaaac tgccctcagt gaagaattgg agttacattc tgcaccttct 900
 tcccttccaa cgccgaatgg catacaatta gaagctgaga aaaaagcatt ctctgaaaac 960
 cttgatcctg aggattcatg cttacaagt ctgacatcat catcacttaa acaaattctt 1020
 ggagattctt ttaccacagg atctgaggga aacgcactctg gaaaagatcc aatgaagaa 1080
 atcactgaaa accataattc cttgaaatca gatgaaaata aagagaattc attttcagca 1140
 gaccatgtga ctactgcagt tgagaaatcc aaggaaagtc aagtgactgc tgatgacctt 1200
 gaagaagaaa aggcaaaagc ggaactgatt atggatgatg acagaacagt tgatccacta 1260
 ctatctaaat ctgagagtat cttaatatct accagtgcaa cagcatcttc aaagaaaaca 1320
 attgaagata gaaatataaa gaataaaaag tcaacaata atagagcatc cagtgcattt 1380
 gccagattaa tgacctctga gtttttgaag aaatctagtt ctaaaaggag aactccatcg 1440
 acaactacct cttctcacta tttagggact ttaaaagtct tggacaaaaa accttcacag 1500
 aaacagagca tagaacctga tagagcagat aacataaggg cagctgttta tcaggagtgg 1560
 ttagaaaaga aaaatgtata ttacatgaa atgcacagaa taaaagaat tgaaagtgaa 1620
 aacttaagga tccaaaatga acagaaaaaa gctgctaaaa gagaagaagc attagcatca 1680
 tttgaggcct ggaaggctat gaaagaaaag gaagcaaga aaatagctgc caaaaagagg 1740
 cttgaagaaa aaaacaagaa gaaaactgaa gaagaaaatg ctgcaagaaa aggagaagca 1800
 ctacaagctt ttgaaaaatg gaaagagaaa aagatggaat atcttaaaga gaaaaataga 1860

F644-88.ST25

aaggagagag aatatgaaag agcaaagaaa cagaaagagg aggaaactgt tgccgagaaa	1920
aagaaagata atttaactgc tgttgagaaa tggaatgaaa aaaaggaagc ttttttcaag	1980
caaaagaaaa aagaaaaaat aaatgagaaa agaaaggaag aactgaaaag agctgagaaa	2040
aaagataaag ataaacaagc tattaatgaa tatgaaaaat ggctggaaaa taaggaaaaa	2100
caagaaagaa ttgaacgaaa acagaagaaa cgtcattcct ttcttgaaag tgaggcactt	2160
cctccgtgga gccctccaag cagaactgtg ttcgcaaaag tgttttgata attctagttc	2220
ttacattatt tggttattta tcggtttgcc aatattagcc atagatttaa accattcaat	2280
tatttatagt tagaggaata tattttaatt aaatgccaga cactcctgct gacaatgaaa	2340
gaaatacttt ggaatgtaat cagtgaagc atttttttga actgtagata aactgcctca	2400
aacaaagacc taataatcag attgttttta ccattaagat acataagatt ttatcatgtc	2460
ctgataattc ttatgggtgga gtgattcatg atctttttca ttaagctctg tatgttattt	2520
aagtatattt aattccagta ataaaaagga aatcatctag gtaccataaa aaaaa	2575

<210> 16

<211> 29750

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

tctgggtggg agttgggagg gtcctgtctc ctaggcaaca gcacatgcac acaagcgacc	60
aataatgagc ccctctccaa agaccagga aggtgatgtc acttccttcg tctgggtggg	120
tgcccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta cccgagagac ccggcgggtg	180
ggaagtcaact tcctcccgaa gacgctgttt cctagcaacc gccctccgcc tctgttatta	240
gcccctctc ctcgctcggg ccaggaccgg ctctgcgggc gccgccaggc ccagaccaag	300
gtgagcagct cctacccgat gcttggtctt tgattctcag ggtcgcggag aactggccgc	360
ggggtctcgg ggccgggaac agaaagcggg acctgggggc catgggggat ccggacagag	420
accgcgcttg gacgtgcacg ggcttgccgt tcgctggtgc tcagcatacg gcgcggtgag	480
gagcggcgag caccgggacg tcacctggcc tggtagggaa cggaaccggg ggcgcacaac	540
gctatgggag gccctgccag gcctctgtc cgagtacggg aaaccgcgat tttaatgcgg	600
ctcatcgca aagcttcgtc gttttgtctg gctctcttta acacttttgt gagaggaaaa	660
attggcttgc aatacatctc gctggctgtt tgcgggttag cattacgac tttttctttg	720
aatagcgctg tatgcaaata tatagataca tttttttttt ggtgggtggtg ctcataattt	780
ttacgccgac gatccttttg atggcctttt aaataagacg tgacttattt tgaaggcaat	840
gttatacttt agaagagagg tgaaaaataa ggtgttctat ttttaattggc agcattttgt	900
cgtattaact tgtaatcatt tatttgcaga ctttttaagt agttgcaaaa ctatttttagg	960

F644-88.ST25

ataacttcca tttgaatfff tttaaacaag cttgttatga gaatttgcta tttctttaca	1020
agaacffff taagtgaaga tgtagcccaa tgttcatatc agatgctfff ctttgacctt	1080
tggtggggaga gtagaatcaa atgtaataaa ataaattctg aagcatgcga agtctgattt	1140
gttttgtata tttcagctac tatcagaagt tgaattctaa taattagcta ttttataaag	1200
gtaacgagaa aaaatacact atgtctgatg aagtttttag caccactttg gcatatacaa	1260
agagtccaaa agttaccaa agaactactt tccaggtaaa gtatttttat ttggaatcat	1320
ttcacagtgt aaacactgta ttagatgggt tgaaattgggt gattctagaa cagtcctata	1380
taaagcaggg gtaaacttta tattactfff gaggttttgc acatgatcat gtttgggctc	1440
catccagtat tacaaactcc cctatatgggt tttaaagacta ccaaagtagc ctcaatacta	1500
gtttcctact aagttaaaag ttgaatcgca accttaaatt gccattttta tataaaaact	1560
tttttttctg ttgtaacata atgtttaagt ttttttttct gttgagtcac tgcaattttg	1620
aactcagcct ctaagtttgc aatattgatt gcatccattt ctgaaatatg ccgagacaaa	1680
agctcttaaa aataccaatt tctttcaaaa taccagtttt taataaatta taatctaaat	1740
tgagccctt cttatttggt accctccagc tctaattata acctgcaatt aatttgttcc	1800
ataatgtgtg tctcctctag ttaaactgag agctccatga ggaagggtc ttgtctgtga	1860
tgctctgcat tgagtatgag gcgtaaagtg ggtacatggc ataaagtgag cttgcaggaa	1920
atatttgta gatgaatgaa acctaagttt gaaagcagtc gtaaatcaag cattgtttgt	1980
ttaaagaatt acttgtgaat atgatactc catgtttgga tggaaattga tttcagtatc	2040
tcatttcagg atgagctaatt aagagcaatt acagctcgct cagccagaca aaggagtctt	2100
gaatactcag atgactttga cagtgatgag attggtatgt gacagtatgg aaacgtgaac	2160
cacttttctt ctttttgctt ccttagtttt gtatttagcc agcccccaa ccacccatcc	2220
cctcaatcac gtatgttaaa ataataccta agcattcact aatttttagat tttcaacttt	2280
tttaattagta gaaagccact cttaattttc aggaagttgt atgattttct ttttttattg	2340
ttgttttgtt ttctgaatgt gtatacgaaa atataaatta attgatggca ggtttgcagt	2400
aaaaggatgg ctgccagtgg taaaccacat tgaagaagac aggttcatct ttaagatcaa	2460
ccctaggagg tgctacagct agttagtaac tagtcccaca gaactaaact tcggtgcaca	2520
ttagaagtgc ttttataaag cttgctataa atcagatttt ttttggtgtg gataaggggt	2580
aaatttaaaa accacagact cttcgtgttt catatatcag tactattata atttggtttc	2640
tcttagctat gtaaacatat taacatttta gtttcaggta taagcataca gaattctaaa	2700
cttggtgttt ttgtttgttt gtttttgttt ttgagatgga gtctcgctca gttgctcaag	2760
ctggagtgca gtggtgcaat ctcggctcac tgcaacctcc acctcccagg ttcaagtgat	2820
tctcctcctt cagcctcctg agtagctggg actacaggtg cccgccacca tgcccggcta	2880
atttttgtat ttttagtaga gatgggggtt caccacatcg gccaggctgg tctcgaactc	2940
ctgaccttgt gatccgccc cctcagcctc ccaaagtgtc gggattatag gtgtgagcca	3000

ccgcacccgg	cctggtgttt	tattctttta	aatttggtga	ataattgtaa	ttgatttctg	3060
taaaaccagt	aataaccaca	gttaaatac	tgctgtatag	ttaacttagc	atttcttatg	3120
atttcttagta	aatctaatat	tctggtgtgg	atggaattgt	agttccaaaa	tttttatgga	3180
aaaaatataa	ttagtaatta	ctaattaaat	tcttccattt	acaaatgttc	ttgattttac	3240
atgaagaagt	aatttgcaaa	taaaagtttt	acagtccata	atctaattta	aatgctacat	3300
gactgattgt	tagggacctt	tggatggctt	tttccagagc	aaacagtgtt	tggttgtttg	3360
gtaccctaca	gacaacacaa	taaatacatt	ttgaataaat	taatgaaatt	ggaattttta	3420
tttcataaat	gttaatgaga	cgtgcctgag	ttagctgtgt	ttttagagct	gcaagtctat	3480
ttataaaata	catttggtgcc	tattcattgt	tagaattttg	tttgtagctt	ttaaggtaaa	3540
ctttgattaa	gttaacgtaa	ccttgacaat	ttttaaaaat	actgttgaaa	acatttttct	3600
tttccatttt	tcagtttctt	taggtgattt	ttctgacact	tcagcagatg	aaaattcagt	3660
taataaaaaa	atgaatgact	ttcatatata	agatgatgaa	gaaaagaatc	cttcaaaact	3720
attgtttttg	aaaaccaata	aatcaaacgg	taacataacc	aaagatgagc	cagtgtgtgc	3780
catcaaaaat	gaagaggaaa	tggcacctga	tgggtgtgaa	gacattgttg	taaaatcttt	3840
ctctgaatct	caaaataagg	atgaggaatt	tgaaaaagac	aaaataaaaa	tgaaacctaa	3900
accagaatt	ctttcaatta	aaagcacatc	ttcaggtaat	ttgttaggat	tactgtaatt	3960
gcatttcttg	gaagtttatt	ttaagataat	cagtcccaaa	atttttatat	ggtagctagt	4020
atatatttaa	gaaaaaaaga	cagacttaac	ttccatttta	cagacctgtt	gtattttgtc	4080
taacttcaat	tttacagacc	tgttgatatt	tgtctaactt	caattttaca	gacctgttgt	4140
attttgtctt	gcatctaggc	tgttgacctga	tagaaagcca	aagcacaaag	ccaaagcacc	4200
tttagtcatc	catagcatcc	atagctgtgg	atctccagac	acctagacct	gtgagcttca	4260
gttttgtttg	taggtgtgga	actggaatgg	aatgctgtct	aatccctctc	acactccaaa	4320
gattagagtt	acagcaatat	tgagactaat	ctttctaaca	gtctttgcca	taccaacatt	4380
gtgccagaaa	attttcttga	catttgatata	tttgaaggat	gagttatgtt	attgctgctg	4440
ttgtttgttg	aagcatccag	gacttcctta	agagaatctc	catttgatct	ctgtattgcc	4500
tatgaaaatc	tactaagatt	cagttttcca	aaggaaagtt	cctggtgtga	tctgggatta	4560
cagttagttc	tgcccacaat	tttactgaat	tttaagcata	aaggaacaaa	gatagaatga	4620
aacggagacc	aagtcctgtc	acataccctg	ggccaccatt	catgaacttg	tatatgcaag	4680
gttaaggatt	ttttgttttt	cattctttgt	attttataaa	ggaattatta	gttgatgtta	4740
accttcataa	aaatctcctt	gcatatcatc	agtaaataca	gtgctggtaa	atatttcata	4800
ctttgcatat	tagataccag	tggtaacgtc	agacaaaact	ttatttcagg	catgtattgg	4860
ggaactgctc	ctttcttcct	gacccacaaa	tctcattaac	tttgaaatga	gcaaaggatg	4920
taagcagagc	aaagaacact	agaataatat	ccaggacact	gggggaaagg	cctctgtata	4980
ttatatatga	cttcagcaaa	taagttaagc	ttcagtatcc	tcagtatgag	gaagctaaaa	5040

ataaccctct ttctattcct gcaaaattgt gagagtttat tgaagtgcac ctcataaact	5100
ataaaaaact acaaaaatgc aaacagatgc ataataaac aattaacttg ttaaaatgta	5160
ccttctaagt atagtgcagtg aaatcaatgc tggagagaag aggaacataa ttgaacttcg	5220
ttattaagaa aatgcgagca tatatagcaa ctaaaaattt gtctgagaca ggtggatgta	5280
tataattaga agtttatggt agataatcag gaaagcaata atccacctat ttcatacctt	5340
aaaaaaaaaaa aaacctgtg gtgggttaca atgaataaga aaatactgta ttttaaccac	5400
aagggtggcat caggatccta aatgctctac ttatatatgc aatgttatat tcagtagctg	5460
taataataaaa ataattacct aaataggtaa ttgtatacat tgattaccaa aaaaagcgct	5520
tttcttaag tataggcatt ttttttctt tttgggaact tgacagtact tctggaagtg	5580
gaatttttgt agaaaatata ttaaagtgtt cattctcagg ttcttcaggc tgaaaagtaa	5640
aaattgaggc tagtgttctt aagataatat ctggcatata taataagtat ttaaagtgaat	5700
aaattaatat atgaatgatt tatctttgaa agaggggaata tggttcatga gtttatcctc	5760
taaattcttt gactttttt ttttctgtac aggtttggaa ctcaatgttt ttaatgtggt	5820
gagatattgc tgagtagcaa gtaatgcttt atgaaactat tagagcttga aggttttctc	5880
tgtccttgct tgtcttttgt aaaaagtata ataaccagac tttatagtca ctactgaagt	5940
gacagttgct ctataaagtg aaagtatttt tcacaggata tgtttttatt ttaatactaa	6000
catgactgaa atcatgaact ttggagtcag gatgcttctc ctttaactcg agatctgcag	6060
cctgctagag tttgtgactt tgggcatgag acctctttgt tctcatttta ttcattctta	6120
aaaacgggat aatagttgcc tgcctctagg agtttgaggc aattaaatga gttcacatat	6180
ttgaagtgct tagaatagta ctggcataaa tttagcactc tataaatgtt ctgattattc	6240
attttattat tttagcgtttg tttataaaca tgctcagcag gtataaagta tcagtcatgc	6300
gggatgcgta agttctagag atctgctgta cattgtgcct atagttaaca gtactgtctt	6360
ttgcactgaa tgtattaaga aggtagatct catgtttgtt cttaccacaa taataaaaaa	6420
aattgactca acaccttctt tcaggcatta tataatattc tgcttaaact gaggtcaaa	6480
agacatgcaa gcatttgtca ggaggagaag caggaagtgg atattctagg cagggggatc	6540
agcttaggta aaggtatggt agcaggaggg attggagggg ttgtggtatg tgtgcatgac	6600
aactgttagc ccagcatttc agaaacacag atgacaaaat ggctgtagat aaggcagtga	6660
aggacaaaac cataaaatcc gttttatgtt gtttaaaggc agttaagctt ttattctgta	6720
ggattggatc atggggagcc attgaataat tttgtagaaa ggagtgatgt gatctgattt	6780
ggattttgta aatatcatgg aagcagtgat ctaggaaaga gtggataagg acccgacagc	6840
agggatgtag aaagtggat aaatgagata tttggcaatt agaattgata ggatatattg	6900
atactctgga tttaggggat aatagagga ggaatctaga gcccttgat ttggggttga	6960
acatttggtt ggagtttagg atgtagctaa aattgtcagc tacttataat aataccaatt	7020
tggtatggtt gtggaatctt ctggcagaat ccataagccc atttttaggt aaatgggagg	7080

aagatgttaa	ttagaccaat	tttgaagttg	agaaaaatgc	atttgtagaa	caatagaaac	7140
ataaatatgt	atagcaggta	aaatgcaggc	aaaaaatata	tacatggaaa	gtcttcccat	7200
tgtttcgaat	actggatgca	aatcagcatt	tgattcttga	tttaaaactta	gaagtaatgg	7260
aaagagtga	attttaataa	atgctaaaga	agttttatgg	actcagaaca	attaactcat	7320
aaaagattcc	ttcctcta	gagagttagc	actcctatcc	cttgagtgcc	aacatcatca	7380
tctttgtcct	tataatagca	cttataatct	tagtaatcta	gtcttgtaat	tttgtttaga	7440
aaaatcaacc	tgtaaagtac	ctggacaggt	ccattgccgc	tttgttgatt	atgagggttta	7500
gtaacgtgta	cagggcttgg	tactcaaagg	cttgatggat	gagcctcctc	attttatagt	7560
ggtagaaact	ggggcaagat	tttgttttgt	ttttttatct	ttaacatttt	ttttttaata	7620
ttataagagt	tcacaatgtt	gaagagttaa	cttcttgatg	ctggttactt	tcaggatgac	7680
aactgtttct	ttactttgtt	ttttttttgt	tggtgtgtgt	gtttggtttt	tttttttttt	7740
ttagatggat	ttttgtctct	attaccagg	ctggagtgc	gtggtgtgat	ctcgatctcg	7800
gctcactgca	acctcagact	cctgggttca	agcaatcctc	ctgcctcagt	ctcctgagta	7860
gctgggatta	caggcacgcg	ctactaagcc	cggctaattt	ttttgtatct	ttagtagaga	7920
cagggtttca	ccgtgttagc	caggctggtc	tcgaactcct	gacctcatga	tctgcccacc	7980
tcggcctccc	aacgtgctgg	gattacaggc	gtgagtcacc	gctcccaaca	tgtcgggatc	8040
acaggcgtga	gccaccgcgt	ccggcctgat	tattaaccat	cattttattg	tgccttacta	8100
gagctctgta	tagagaagag	ttgtgggctt	catctggact	cttcaggaca	gagaacaaag	8160
gggcataggc	acaggaggga	agtatggtag	caccagagaa	gatagataaa	gcatgggtca	8220
tttttttata	cacacacttt	aagcatttta	tttttcagca	gaaaacaaca	gccttgacac	8280
agatgatcac	tttaaaccat	cacctcggcc	aaggagtatg	ttgaaaaaga	aaagtcacat	8340
ggaggagaag	gatggactag	aagataaaga	aactgccttc	agtgaagaat	tggagttaca	8400
ttctgcacct	tcttcccttc	caacgccgaa	tggcatacaa	ttagaagctg	agaaaaaagc	8460
attctctgaa	aaccttgatc	ctgaggttag	cactaccact	aaactgttga	attgtgttct	8520
tgaatttatg	cttttttatc	tgattatgaa	aaagagaagg	agagaatgaa	tttgtgtgcg	8580
tgtgtgtgtg	ttttacatac	tttcttctgc	aactgataag	gaaataattt	ttaaaaatac	8640
actgtattcc	accgagtcta	aaactgcctc	aattgtaaga	cgtagcatta	ttttacatac	8700
cactaaggaa	gaaggaaatg	catccaatta	aactataaca	caccagtgat	tgtagagttt	8760
atccagtttt	agagaaaagta	aaatgtcaaa	aagtgttgct	tttctgaatc	tatataatag	8820
tgtttatctt	taataatttt	ttaaatttat	gtatctttga	attatgtaat	ttatggctaa	8880
gaacaatata	gtcagtgtca	ttttatttat	ttgattttat	tcactcaaca	aatgtgtgtt	8940
gaatgttcat	ggcactcttc	tgtgttcttt	gggttatgtt	ccaatagcat	taaatgtggc	9000
ctttcaggtt	tccatcaggg	aatttactat	gcattgttat	taaggagagaa	cacttcgttt	9060
ttctctttgt	atttcactat	gagaagcaaa	ctgtcccttc	tgaacatttc	agaagggaaa	9120

F644-88.ST25

agtacaggaa gaacatttct tccccataat ctgcttgggc agattagggga actgcatgcc	9180
acctggccaa gcttctttct tttctcatc gcttgtctgc agtggttggtg cttaaggatc	9240
tgctctctgg gaggtgaggc agaaggtgct gagaggagct cttttgtgca atgactaaat	9300
gggggaatcc ccctaattca gactggaagt attaggaagc acaataggct accaattcaa	9360
atcttgttct gcagttgagc tttaccagta aagctgacaa tttgatatac gcctaactga	9420
caccaccatg ctgtttctta atttgttctg aaaaccagaa gaagaaaccc aagcaaatac	9480
tttatattta agaaaattat ctgatccatt gaatattgtg ctagtttctt gtagctgctg	9540
taacaaattg ccacaaactg gttaacttaa aacaacagaa atgtattctc ttagttctg	9600
aggtcagaag tccaagatca aggtgtttgc agggccattt tcctctgaag gcatcacgga	9660
agaatccttc ctgacctctt ccagcttctt tctagtgggt gccagcagtc catggcattc	9720
cttggttctt agctggcttg tagctgcac attcccttct ctgccttcat cccatgtggc	9780
cttcttccct gtgttttctc tgcattgtctg tgtctcttct ttctcttaaa aaaagacacc	9840
aggcattgga tttaggggcc accctaattg agtggtgctt catcttatct atttaaagct	9900
gtaaacacct tatttcctaa gaaagtcgta ttttgagggt ctggatgaac atgaattttg	9960
gggcattaat gttcgtatgt taaacctagc attcccgga taaactctg ttagtcatgg	10020
tgtgatattt tattgtggga tgtgatttgt taaaattgtg ttaaggtttg catctatatt	10080
tatgaagtct attggtctgt aatttttttc ttataatgtt accatcaggc ttgggtatca	10140
aatgagttgg ggagtgtctt ttcttcattt tataaaagtt tggatcatt attttcttaa	10200
atgagaggat tcaccagtac aattatctgg gcctggaatt ttctgtgtgg agacatcttt	10260
ggcattacat ttgatttttt aaataggtat ttcagtactc acattttctg ttttgccagt	10320
ttggtaattg tgtctatcaa gaagtttgc catttcatct gatatgttga gttataaac	10380
agagtgttgc acgatagtc ctcattcttt tgatgactag gattatcatg acatttcatt	10440
tttatttcta acatatataa tttgtgtttt gtgtctttcg tgctaaatct tgataggcat	10500
tgcttagtct tattaacgt ttttaagaac cacttcggct ttgtcatatg ttggtgcaaa	10560
agtaattgca gttttggcca ttactttcaa tgacaaaaac cgcaatcatt ttgcaccaac	10620
ctaataattt tctctattgt ttgtttaatt gattttcagt attatttcag tattattcag	10680
tattattctt tttactttct tttttttttt ttgagacaga gtctcgttct atcgcccagg	10740
ctggagtgca gtggtgcaat cccagctcac tgcaagctct gcctcccagg ttcactccat	10800
tctcctgctt cagcctcccg agtagctggg actacaggca cccaccacca tgcctggcta	10860
atTTTTgtat ttttagtaga gacgggggtt caccgctta gccaggatgg tctcgatctc	10920
ctgacatcgt gatccacca cctcggctc ccaagggtgt gggattacag gcgtagacca	10980
cggcgcttg cctcttttac tttcttttgg ttttaattgc ttatcttttag atttgaaaat	11040
ttctcattc atttttaaga ttttcgtgat ttctgctaaa cctgttgaaa ggtgtaaaact	11100
ttcttcttg tactgcttta gtggccccga tttttgatg ctttttattt ttattatcat	11160

ttcttttaaat	atatatttta	acttcccttg	tgatctcctg	ttttaaaaat	ttattttttt	11220
agttgaaaaa	taataattgt	acatggggta	catagtgtt	tttcgataca	tataatatat	11280
agtgtcatt	gtgatctctt	tttgaccag	ttgggtattt	tatggtgatt	tattttattt	11340
tcaaatactt	gttttttctc	tagatatact	tttgatgtta	attataagtt	aattttgttg	11400
tagtctagag	aatgtatctt	acatgatttc	aaatttttaa	aaattattat	tattatttct	11460
aaatggccca	gcttttagtgt	atcttgtgaa	agtctcattt	gcattctgca	agtagatgtg	11520
ttctccaggt	gttgaatata	atgttgtata	atttaagttt	ggccaacatg	gttggttaata	11580
tcattcagat	cttctttatc	cttactgtt	tttcatccaa	tttgtttacc	cgttaccaac	11640
ttaggggtat	taaaatatcc	agttatgttt	gtgggtttgt	ttatacttct	ctttagtctt	11700
gtcagtattt	tataactttg	ttatcaggca	catacacatt	tattattatt	atgttttgag	11760
cattatgaaa	cgtctctacc	tctggtaata	ttcctttcct	tatcttatag	attgttttgt	11820
gtaatacttc	agctttctta	tgacaagtgt	ttccatggta	tatgctttct	atcttttttc	11880
tttcaaacta	attctgtctt	ttcatgtaag	tgaatctctt	acaataagag	tttggtgtca	11940
cttttttatt	aagtctgaca	atctatgcct	tttaatgtag	tgtttagtcc	atttatgaat	12000
gttttgcca	tttaatgtaa	atactgctat	gattggattt	aggagcaatt	tgttgctctt	12060
tattttctat	ttatctgttt	tttaaaatta	ttgtttttat	tgttgtttct	ctgttactcc	12120
tttcttgctt	ttttttgagg	agataatcat	gaatctttta	gttttttatt	attattgacc	12180
ttttatctat	atttgtttgc	attgtatttc	tcagagttga	tcagtggatt	acagaatata	12240
tctgaaaatt	atcacaatct	atttagaatt	gatattgtat	tgtttcacat	ttgatctaga	12300
aaccttgga	taatatagtt	ccatatactc	cctcatccat	tgtgctattg	tcatatatta	12360
tatctacata	tcctataatc	cccacaatag	agttataact	ttttcttaaa	gagccctttc	12420
agttttttgt	attagacttt	taaaaaatta	aagaaggcta	gaataaatat	atattatata	12480
tctactgtat	tatatattgt	atatattata	gataacattc	tattgctaaa	tatagataat	12540
atatatttgt	agacaatatc	tatatatagg	taatatatat	tctattctta	tatattatat	12600
agatatataa	catctatata	atctatttat	agatattaca	tatctataaa	tacatataca	12660
atttctaggg	atcttcattt	cttcctgtag	attcagatta	ccattttgtg	tcctgtcagt	12720
cttacaact	tattttacat	ttcttgtaat	acaggtttac	tagtgatgga	ttttctcag	12780
tctttgcttt	tctaaaagta	tttgctcat	ctttgttttc	aaatgggtgt	tgatgtgatt	12840
gtattcttct	tgtctaacag	ttgccttctt	ctacctccag	ctctttatag	gtttccattt	12900
ttattggcct	ctcttgtaat	cattcatttc	attgtcctct	ctafataatg	tgttgatttt	12960
gtctgaatgc	tgtcaggaat	tttactcaag	attgtggttt	ttatcttttg	attacagcaa	13020
tttgactgca	tggtgcctgg	gtctagcttt	ctttatgttt	attctgcttg	acgtttgttg	13080
agctttccaa	acctataagc	tgatactgtc	tgtgaaatgg	gaagattgtt	atttcccacc	13140
ctatttttca	tcctctcctt	ttgggtactgt	agttacacat	gcattgaaat	ttgtgctata	13200

F644-88.ST25

```

tctcactgat ctctgagatt ctgtttatat ttcttaaattc ttttttctc tttgttttta 13260
agattgaata acttgatatta cttagtcttc acgtttacag attgtggtcc ggagaatgta 13320
-----
tcttttatga ttcaaattg tattaaatta tttgttttg ttttaatggc ccagcaaaag 13380
ggtatgtcgt gagagtcca tttgcagttg caaagtatgt gtgtttcca ggtgaatttt 13440
ttatttcaact tattgtggtg ttcaacttca gattttctat tggatatttt tctgtttttt 13500
aatataaaat ccccatctt ttcagccatc atgcatatat tttcccaaa gtgcttgaac 13560
atatttatat tagctatttt aaagtccttg tctgctaact ctaaaacgtg agtcatctct 13620
gggttggttc ctattgacca ttctctgttt ttttattttg ttttttaaatt aagtgtcacc 13680
attttctgtt tctttagtga cttttgattg aataccgggt gttctgaatg atattttgta 13740
-----
gagattctgt attcttttat gtcccttcaa acatattttc tagcaagtgg atatcatggc 13800
tggacacaaa ttcccaatcc tgtttctcct gcagtggata tcagctgaaa tttctgttta 13860
attcttttca gtttctagct tctatgcttt tacaggatcc tctgaggtct cccttatgcc 13920
acaaatagag gtggtaaagg tttttggtga atttcatatg cagattttgt ggtcactgtc 13980
ctctgctatt ttccacatac ttattggctg atctgatggc cctagactca gtccctgtt 14040
ccctcaagtc attccaccaa ggctgtagcc ttctattact tgagctgcat agactggaga 14100
atgccttctg gcaaaaagct actaatttgc agatctctc aggtgaagct ttatctttca 14160
gggtagactc cagtgtctca gcacttcttc cattttctca aatgttttct ctccattgct 14220
tttgacatat aatttccttt gcaccataa aatactgcgg agaaagaaaa ttaaagtatt 14280
tgtacaacaa agttgaactt cctacattgt aatatcatta ctttaggct agatgattct 14340
atgaagaaat gtttacctta gatagacaaa tataattatt tcatatcaga tagaattttc 14400
agaattttga ggaaaactca agtgcattga atctatgtgc ttttctatc taaaatattt 14460
ggaagtagcg gcttacttga ttttattaaa tgctttcatt tggataacta gtaatatttg 14520
cttggaacta aagtatttta cctgtcttct ttatgctttc cttcaaagga taattgtagg 14580
aagagctatc aaaatcaaat cttggcctta aatatttata agaaatgtga ttattaagta 14640
ataggagttt tgaaaattgg taaaaataa atagagaggt ggtggtagtt aaagaacttg 14700
aataactctt tcagtgacct cttttaatga ccaagacatc aaggcttgaa agtaaagcat 14760
gcttacctcc attggcttgt cacactttgc gtttcagcaa caaatgccta aataatgcag 14820
atttcagagt tatgcactat ttcaatttgt agttttaata atgctattgt tcccataaat 14880
gttaattatt aaacttatgt ggcaaagtga tttttttttg cgaaaacagg attcatgctt 14940
aacaagtcta gcatcatcat cacttaaaca aattcttgga gattcttttt caccaggatc 15000
tgagggaac gcatctggaa aagggtggtta tatctaataa ttatatctta tatgtgaact 15060
ctgtactact tagactcctg tttgtaagag aaataatact ttgtatagtt ataagagaaa 15120
tatatgtttt tatgtgtttg agttttaatc ctgactatgt agttaactaa ctgtgatttt 15180
ggatgcagaa cttaatctct cagtgcctca atttcctaa gttatattat ttgtctcata 15240
-----

```

F644-88.ST25

aggttattgt gaaaattaag tgatatagtg ctttttagcc attagcctag ttaatagccc 15300
 aagtggagtg agcacttaag gtaaactact gttatgtatg tgttgctgtg atattctgca 15360
 ggacaacata atagctaggt ggaattttaa agtgagacta agctagattc caatacaggc 15420
 acaattacat aagcaaagta actaaccttt ctgaccctgt atgttgatct ttaaaatggg 15480
 taaaataaga gtaatttgcc ttataggggtg ttgtaagaat taaacatgta aagcatttac 15540
 agcaatacca tagtaagcac ttgggtgtgat atgtgaattg ttaacataat ttcttttctt 15600
 agtgatacgt agcttaaatga aacctaanaag acatagctat ttctaggtct gagatgtgta 15660
 atgaacattt tagtgcttac tatgtagtat cttttttgtc attttacaga tgagaaaagc 15720
 tgaagtgcag tgacttaggg aaacataccc aaggtcagtg atggaaccat agttaaatct 15780
 tgagttccaa agttcttggt cttttcactg aacagattaa cagctccaaa gaatccaata 15840
 gtgaattgag tgattttaag cccatgttac ctcaaaacaa attccaaaaa aatggtcata 15900
 atgaaaccaa cagaattaag acttttcaca gtaaagattc aggttttagct gcaagggtgga 15960
 cgttggtaga actgaaagtt ggtgatccca ttccaaaatg tggtaaaatc agaata~~gtag~~ 16020
 aagcaattct ataaatgcaa aactgaatct tcttatgcca gagcttgagc ctgtttcttg 16080
 gagcactgag aggataagca ataggcttgt ctttattgcc ccttatggta tcagaggaag 16140
 tactacatct tggtgagatg aaactcacta gagactgtgt aaaattgcat taattcttgg 16200
 ttctttctgc agctatacaa ttcaacaatt gtactactag taactgtagt agcctagaga 16260
 ggtgtgacac cttcttatgc agcgtgttgt tccagctaag aaactcaggc tttagagtta 16320
 aacaaatatt gtcattctac ttacttggtt tgtatatcaa caagctcttt tgacatgtcg 16380
 ttgttttagg gtagttattc cattctgttt attaatatgc tatttttcta agtactagat 16440
 ttgttaagtg cttcattagt taagcctaga ctattttttt ttgtaaatca ctttcgaaaa 16500
 gagtttatgc aagtttaata tgataacttt tcttcatatt ttgcaagaaa aaagagtta 16560
 tagatagtcc tcatttaaaa gaaagcaaat gaatcaagta ttaccttat taattcagaa 16620
 ggggggtttt atgctattac tctgtctcaa aatagatcca aatgaagaaa tcaactgaaaa 16680
 ccataattcc ttgaaatcag atgaaaataa agagaattca ttttcagcag accatgtgac 16740
 tactgcagtt gagaaatcca aggaaagtca agtgactgct gatgacctg aagaagaaaa 16800
 ggcaaaagcg gaactgatta tggatgatga cagaacagtt gatccactac tatctaaatc 16860
 tcagagtatc ttaatatcta ccagtgaac agcatcttca aaggtatttg taaaaattca 16920
 tacttttcat actacagctt aaaacttgaa atagaacttt aagaaatttt atcttctgtg 16980
 ttatatactt ctgaattacc agtggaanaa ttatcttttg atagtatat tgtattgtca 17040
 catggttctt acttaatcca ataaaattta actttaagga aagttttagt tgaatataat 17100
 gaaaccagtg gtttaaaaat tatcagaggt gtgtgatcat aatatacttt taaatgtctc 17160
 agaatgcat actcatagtg tatatatttc cataggtctt catattttta aaatataact 17220
 gtctggaata atttctgaga ttttaaatga gagttatggt tttggatatt gttttaaaac 17280

gtgttaacaa ttttaacaaa aatcttaaag aaatgtttat caacagttta tcaacatctg 17340
 tgcttcttta aaatagatgg ttatcatcag gaacattagt attattattc gtatttgatc 17400

 ctttgccctt atttccctaat tttcaaaaata atgaactggg gccctggcaa cctccagagg 17460
 tgatgaagtt gctttgtttt ttcttttttc aattcatgta aatttaatgg ttacaagtgc 17520
 tttttgttta catggatata ttgtgtagtg gtaaagtcag acttttagta taaactaaaa 17580
 tgtacattgt acccataaag taatttctca tcccgacct cctctcacc tttcctagtc 17640
 tccattatct attattccat accctatata catgtgtaca cattatttag ctctgacttg 17700
 taagtgaagaa catgtacat ttgactttct gtttctgatt tatttcactt aaggtaatat 17760

 cctccagttc catcatgtt gtaaaagata ttatttctt tctgtgtggc tgaatagtat 17820

 tctgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atacacattt tctttataca 17880
 atcatatgtt gatgtacact taggttgatt ccatacttt gctattgtga ctagtggtgt 17940
 gataaacatg agtgcaggta tcttttttat ataatgattt attttccttt tggcagatac 18000
 tcacagtggg gttgctggat tgagtggtag ttctatattt agttccttaa gaaatcccca 18060
 aactattttc cataaagatt gtactaattt acattcttac caagagtata caagcattcc 18120
 cttttctctg tgttctcacc aacatctgtt acttttttaa ctttttaata atagctaaat 18180
 attctgacta gtataatata tctcactgtg gttttaattt gtgtttctct gatgattagt 18240
 gatggtgaac attttttttc atgtttcttg gccacttgta tgtcttcttt tcaaaaagtc 18300
 tattcatgtt ttttgccctc tttttagtgg ggttatttgt ttttgttgt tgttgttgag 18360
 gggaacatta ttattataac ctttaagaaac agatatgtaa tatgtaggat tacttgtccc 18420
 tacattaaat tgtgcctgag tgctatactt taaaaattta tgggtgtagca ttttcagtct 18480
 ttgtttctcc tgaatttgtc attatctctt gtagctgcaa ttagctagca gctctgtgtg 18540
 tttattatca gcggaagaaa acagggctag ctgaaaattt gtgtttgagc aatactttta 18600
 taacataaaa tacaagcttt tcttaaaatt gatgaaggag gttcattaag ccatgttcca 18660
 ggtatatcat ccttagctaa tttctttagg aaaaaaacac tactgctaag ttagggatgt 18720
 gtttattatg tctgtgctct cactttacca ctagcaccca tcagtctgtg taaagtagaa 18780
 aagttgttcc ttaaaagaag aaaggatatt ccggagttaa tagacaggat tgtagaatgt 18840
 ctaatagagg caattctaaa ttagaacagg catttcatat gtaacaagta aggttgtaac 18900
 ttgtttcttt tgactggacc cttggcctca ttcttactct ctactgaatg accttttcta 18960
 aacagaaaata taatcattct ccattaaagt cttttgttg gtttctcatc acaagaattc 19020
 catccagact cctcatcgct gcctagtgat ctacactggg tcttccctga ccacgtcttc 19080
 ctccgctttc cctgccattc actatgcttc agctccattc acctctttct gttttcaga 19140
 gataacaggt tccgtccctt ctacaggcttt taccacttg ctgtttcttt cttcataga 19200
 ctttcggtg ggccctttgc actcttagct ctgatgtcag cccctcagga cagccttccc 19260
 tgaccaactt ctttaaagca gtcctcagc cccactctag tcattctctg tcaactgcaca 19320

ctatTTTTatg tccttcatga gccatgTTTg cttatatatt tatttttTggt catccgtctc	19380
tagaattttaa tatttcttaag ggcattttat tcaactgattt gctcccaatt tctactgtgt	19440
ttgacacata gtagatgctt aaagaatagt gattttactgg cagtttTggct tctaagccta	19500
aaaaggatag ttgtcatgaa taaatcatct ttggcatttt ctgtttaata gaaaacaatt	19560
gaagatagaa atataaagaa taaaaagtca acaaataata gagcatccag tgcattctgcc	19620
aggtaataaa gttaccaata tttgtcattt atgggctTgc attctagcaa agctagtttt	19680
aattttaactt tcataaagta aatttcatTTT ggtgttactg tattttcttt ttatttccat	19740
ttcataaaat gaaagtagtt aacttcatga taaaaccctt tggttgatga tattatttga	19800
aataaagtaa tttataaaaa gtaagtctat tactgattgt tttagtgcct ggaatgttta	19860
tgcaatacct ttgctctcca ggatcgTcct aggaatatTTT ttcttctttc ttaatgtcag	19920
Tgattaggga ttctttTgtc tccagactgc ttctTgaata gagcttcttt ctctacttt	19980
tcctgagaca agcaatataa aatggtaata aagctgaagt ctagcaatga tacttattca	20040
ttatcaagta tcattgtcta acatgagaaa ttgtactgaa agccttcaga atctatgaac	20100
taagtaggtt tattaaaatg attatctgta tagcttcatt cacaccaatg ataatgaatg	20160
cctaactcat aagtgctaT caaaaacctt ctgaatcttt aaaattatcg ttagtcaaT	20220
tatcattaat caaataaaac agagctagca agctttttct gtaaTggcc agttagtga	20280
tatttttaggc ttgtaggcg atacagtctg tattTgaact actcatttct gctattttaa	20340
caggaaaagca gccacaggca aaacttaaca tgaatgatta cagctatggt gcaataaaT	20400
ttgtatatca aaaccaatgg ctggccaaT tttccacca atccctgata tagatagtac	20460
tattctttct aattttatat ttggaatgct tcatgtaaca aaatgatgaa agaaaatatt	20520
aaaagagtga ttataaccta ctgtattgtt ttttccatgt aacttgagaa gtggtccata	20580
tttcttaagt ttctaattac aaatatttaa aaagagcaat catttttaaag ctatataact	20640
taaagttata aaatttaaT tatgttgaag gggacatatt taagttatgt ccccttctac	20700
ataatttaaT attctttgta tactaagact gtacatttta cctacatcat tttcaaagta	20760
attataattt gttaaattat aatgtagttt ccaatttttt ttttgagatg gagtctcact	20820
ctgttgctca ggctggagtt cagtggcatg atctctgctc actgcaacct ctgcctctg	20880
ggctcaagct atcctccac ctgagcctcc agggtagcta tgactacagg catgtgccac	20940
cagccagct aattttttgt atttttggtT gagacagggT ttcaccatgt tgcccaggct	21000
ggtcaacagc ccaacaggat gagctcaagt catccacca ctttggcctt ccaaagtgt	21060
gggattacag gtgtgagcca tcatgcctgg ccagtTTtca aatattatac gtgcatattc	21120
taacagatct ctcttctacc aaatgcaatt gtaatatTTT gtcttgattc atttgatct	21180
tttcagatta atgacctctg agtttttgaa gaaatctagt tctaaaagga gaactccatc	21240
gacaactacc tcttctcact atttagggac tttaaaagtc ttggaccaaT aaccttcaca	21300
gaaacagagc atagaacctg atagagcaga taacataagg gcagctgttt atcaggtaaa	21360

aaaggaaaat atttttaaga gaagaagaat gatcactttc ataagcctac actgtttata 21420
 aagaataaag taatcctgat agaaaatgat ggtttaatac ttaaatttat tgagaaagag 21480

 tttcctttta atacatgagt aatcatatct tactaaatta tttgcttcca cactttgcat 21540
 aactgaccat agttgttttt aaagaaagaa tatgccattg caatttatag aaatacagca 21600
 caagccaaaa cattgtaaag tctatatatg ttttcatttt tttcttcttg aagtttatat 21660
 gaacaaaagg agttattatg aacaaaaagt tattaaatct tttctttcct gagatgttgt 21720
 taggcgtaca taggaaaaag attgtattaa tttattcaca attctaaaag tctttttttg 21780
 tcttttttag agtagaatag tatacttttag aaaattgtac atgtgaattt cagagaaaat 21840

 gttaataata agaattctaa ttcacttaag aaattttaaa tattatatga cttttttctt 21900

 gttcttatag gagtgggttag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa 21960
 aagaattgaa agtgaaaact taaggatcca aaatgaacag gtattctgac atatagaagt 22020
 aaaaatgttt tggattttta tttcagtaaa atatccctga atatataact tttctaaatc 22080
 agctttttta atggcaaaat aacttgtata ttaaagaaat gatttccggt tttacttctg 22140
 ttttacttta tacatttttag tttgatataa ctgttttaca tgaaaacaga ttttaatttt 22200
 gtatatgtat aggatagctt tgttctgct gattatgaag ttattattgt ttatgagcac 22260
 ctaattcact tttaaaagt gatttcattt agaacttaac caagaaggcc aggtactgtg 22320
 gctcatgcct gtaatcccag cactttggga ggccaaggca gatgggattc cttgaggtct 22380
 ggagttcgac accagcctgg gcaatgtggt gaaaccccat ctctactaaa aatacaaaaa 22440
 ttagccaggg atggtggtgg gcacctgtaa tcccagctac tcaggaggct gaggtggcag 22500
 gatcacttga acccgggagg cggaggttgc agttagctga gatcgtgcca ctgtactcca 22560
 gcctaggtga cagagactct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa ggcacgacaa gataaaggat 22620
 cattagacac tagttagcct tcaattttcc tcttttctct cttgaatttt ataagtatct 22680
 tcaagtccaa cccctacctg aactcttgat ctgtatcctt tccattgaa tggaggtgaa 22740
 cttttgttcc tgtctcttct gtactgagtc tcttctctta actcctgctt gtaatacgct 22800
 cagttatttc ttatcttcta aagtcaaact tctggacaaa aactccagtg tgctgttcaa 22860
 tactaaaaat agatttagaa gaaaaatatt ttccaagggtg aactgcacga taatgcgtca 22920
 gtagtgaagg gagcagccct ccagggggag tgcctgtcta tctgttaacc acgttcatag 22980
 cagtatgctg ctgtggtcag tgccataccc ctctcattt gattttcgta gctctgtgag 23040
 gtagatagta ctttgacctc taaattatgt taccccaata ttaaggtttt atgtcattta 23100
 atattgaaca ataaagcaaa catagaatat tatgggatta gattgaagga agtaaaataa 23160
 taacataact tgctatacag tctccaacct atttttcagt cgagcacata ctttcaacat 23220
 ttggaataca tttgtgcagt aagaacttta tgttttgata ctattcaaaa ttaagattta 23280
 aacaaaaaat ctgcatctta ctgcatggct tggccaattt gccttactct aacttacttt 23340
 ataagcccat aactttactg attttttttt caaatatttt attatgaaaa ttttactata 23400

ccacttagcc	tattacagtt	tattttgata	taatttgttt	agtacacttt	caaaaataat	23460
agttgacatc	tttctcatta	ataggtcaat	atgtgataaa	tgttttttaga	aaaggacgtt	23520
ttaaaaccaa	tgaataattc	agataacatt	ctttgtaaat	tatctaagcc	attctaaata	23580
aattacctac	tttgaaagtt	aattttctaag	tataatgaat	atcagaggac	taaagataaa	23640
tgtatatgtg	tatatattata	tctagccata	tttgtgtcta	tgtatatata	catatatatg	23700
tatatcactc	tattatTTTT	tccactgtag	aaaaaagctg	ctaaaagaga	agaagcatta	23760
gcätcätttg	aggcctggaa	ggctatgaaa	gaaaaggaag	caaagaaäat	agctgccaaa	23820
aagaggcttg	aagaaaaaaa	caagaagaaa	actgaagaag	aaaatgctgc	aagaaaagga	23880
gaagcactac	aagtattcag	aactttgcac	atcttaatta	ttttaaaaca	tttgaaatcc	23940
aaattaatga	ttaaccatat	ttttatttat	tttcaaatat	tcacagtaag	aaaattattc	24000
tgaacttttt	caggcttttg	aaaaatggaa	agagaaaaag	atggaatatc	ttaaagagaa	24060
aaatagaaaag	gagagagaat	atgaaagagc	aaagaaacag	aaagaggagg	aaactgttgc	24120
cgagaaaaag	aaagataatt	taactgctgt	tgagaaatgg	taatccaaaa	tcataaatat	24180
tttgatatat	tttaaattat	agtaacactt	caggatttta	taaaatttat	ttacttgaaa	24240
tttagtaatg	catttcaatt	tcattactgt	caaagatgta	ctagggaatc	tttattatgt	24300
attttccttt	aactctccag	tgttttatac	tatgctctat	aggaatgaaa	aaaaggaagc	24360
ttttttcaag	caaaaggaaa	aagaaaaaat	aatgagaaa	agaaaggaag	aactgaaaag	24420
agctgagaaa	aaagataaag	ataaacaagc	tattaatgaa	tatgaaaaat	ggctggtagg	24480
tattatTTTgt	caatgcactt	tcgtctTTTT	catgtacctt	tttgttcttt	tctgtcccta	24540
attctaattc	tatttgctcc	agacctactg	atcattttcta	cctggaatct	gctttgttga	24600
attcaagctc	tcctcctgca	tatagcatat	tttctttgac	ttagtcattt	ctattaatgt	24660
ttctactatt	ccctcaaaca	cccaggctga	aaacttggtta	taatcttctt	ccttacctgc	24720
atccccacat	ttaccattta	ctattcatgc	ccattcttcc	tttgctgtga	ttctcacatc	24780
taacatagaa	agaagacaag	tttactattg	agggtagctac	gtggtggaac	ttggtcatga	24840
caaaaagtaa	cactgaactt	aatagtgaga	aaattattcc	atcttttatt	ctcttttgat	24900
gtttctgatg	acctcaagga	gaatctctta	tttaggaatt	tttaatgaaa	gagagcaggt	24960
ttgaggttta	ggaggagcaa	tagctagctg	aaccagatat	gtgtatatat	ttgatttcac	25020
tttacttatc	tttataaaaag	ttactttttg	ttgatgtcaa	gcaaaatatt	attttccatt	25080
ttagaatatc	aatataaata	tgcattttgt	ccatgtttat	ataagtaata	cattactatg	25140
aataaatact	ttacataagt	aggtaacaca	ttcatatgaa	tagttaacat	attcatatga	25200
ttcagcaacc	aaaattatag	tatttttgca	ctagaagtct	atccagtcag	gtttcctatc	25260
aaactttaaa	acaactcata	ccaatcaact	aatcatcca	ggttgTTTTt	gatttgcatt	25320
tctctggtta	gaattgagct	tgaatatctt	ttcatttgta	tacaggccat	ttatctatta	25380
ttttctctgt	aaattgtcat	ttcatagact	ttgcacactt	ttctattaga	ttgttggttt	25440

F644-88.ST25

tttttcctta ctggtttcta gaatcttttg ttttgactg gggaaattag cctatcattt	25500
tttataatggg ttgcaaatat ttacccccac tatattgttg gtttcccggc tttccttata	25560
gtaatcatg ccatgaagaa tttaaatitt aggtgtcaga tttctgtttt ttttttttg	25620
cttttgattt tcaagcatag ttgaaaagac ctacacaatt tgagattaaa cagaattatc	25680
ttatttttct tctaacaact ttgtgacttt aatatcttaa tgttttaaca tttgttctgc	25740
ttggaatttg ccctgataca tgggtgggaaa tatgatttca acttttagttt ttccaaatgt	25800
atcctttata aagtagccca tttttacca ttgatttgag gtgctacttc tgttatatga	25860
tacctttctca tgttttcggg tctgtttctt aactttctgt tccattgggtc agtctcgtga	25920
ttccagtgc acacttccat tattaggctt gatatgtcta aatatctgct tggattcatc	25980
tccttttata gttcttcttt cacagtcttt ctgaccagtc ttgtttattt attttttcca	26040
taaacttaag aatcagcagt agttagaaaag gtacatggga ccaaaatgag cgattttaaag	26100
ataggataaa aagataaaac aataataaac ttaagaaaca tgccagacca acataaagaa	26160
aatgttagaa ctctcctgaa caacacaaat gaagacttga gaaaatggat cagaattgcc	26220
catgcacaga aacacactta accttataat gatgttataa ggatgtcagc tctccctgaa	26280
gtcatttaat gcaatcttaa caaaagccaa caggattttac tctgtgtgtt gagtttagta	26340
ctgctatatg ctaattcgat gcagagaaat agtaataaaa taaggtaatc aaaattgggt	26400
caattttgaa tgaaaaaggt agtgtttcat gatgatttcc ttaagttaat ctgttaaata	26460
atgctatgtt ctaaaaaaaa atttaaagtc cacttatatt aagaagatgt aactgactg	26520
ctagtatcaa ttagggaaat taaatgtaaa catttgagtt ttccatttta attccatatc	26580
ttcatgaaaa tggaatagaa tttctttaat aagtcacatt taggtatact gtttttaatt	26640
atagcactta attacattgt cattcttctc agtcctctga agaacaagaa ttcctcaaag	26700
accaaagaca aaataacatg tttgatatct agtaaaatgt ctgcaaatat agtacaccta	26760
taaacacata aacatacatg ttacagatcg gttctccttc ttaccaaatt cttattgaaa	26820
tttgtttgca gatagaatag aaaaattgcc cctgtatagg agtctaataa cttcagtttt	26880
catggaaaac aacatctcaa gctttttata tacaaactag tttgaacagt aagcatttg	26940
tgggtaattg ctttagggga aagttaatag ccaaagatca ggtaagacta aaatattttt	27000
cttgccaatt accagattaa ttcattcatta ctttagtaa gaaaataagc aaaaagctca	27060
gttttccaca aataaatgtc tgaaggactt ttaacaagg ttcttttaatt tactatcaag	27120
gtgactattg attcttttga actgatatta cagttaatat aattgtctat ttgctaccct	27180
ggctttacag ctccctgcta gtaagatgaa gcatatttca agttactgcc ccctcatgtt	27240
aagtgaattt acaaaaagag atttattcag tcaatttctg tggacacagt ctggtcactg	27300
cttttcttcc gcctagctag atggtctgtc tctaaaatat taaaatgatt gaagatgatc	27360
taattacagc tttgcttttc tcaattaaaa ttctgaaagg aagtttcctc tttgccttat	27420
tagaaatagc aagcaaaca acatgcaagc attcttatga catggaatga ggatatgggt	27480

F644-88.ST25

gttaacattg acaaaaaaca aacaaacctc ccacttcact ttgtttgtta catgtgaatg 27540
 gaaagcttgt cctgtattgc catattattc ttgtggcatt tatatatata ctgatgaaaa 27600
 gatgcataca tacctaataca ttttcataa tgcctttcct cccaagccat caacctgcag 27660
 aggcagggtt cactaagggt tttcctgctc cttgaggaat atgagaaaaa taccaagatg 27720
 aagaaaccac caaaccttat agtgtttagca gagacataaa gggacacctg gtgcccctct 27780
 tccattttctt gtctcctgcc ttctgccaag ccttagtcac aatggatatt tttgtttcct 27840
 cccacagcac acattttttt tcccactctc agagccctca ccaactactgt ttgcaagcaa 27900
 agctcttccc cgatatttat cagcagtggtc ttctcttctc catcatgtca cacttcaaag 27960
 ggactttccc tgagtccatt tttgttgaa agtaaatact cttttttatt cttctctata 28020
 gttttaaaac atgtttcaga gaaattcaca caatttgga ttatctgttg tttattttct 28080
 ttgtttctgt ccattttgaa agttccctgg gggacagggg ccatatctgt gtgttgggat 28140
 tttaaaaaat tattttttatt tgcaaatac acataaaaag tgcacatatt tatggaatac 28200
 agtgtgatgt ttccatctac attgtataca ttgtgtaaca atcagaaatg actcacaaag 28260
 gtaggcaaaa tgtttgatgc aaagatatca ttaatattha ttataggaaa gtacacaaat 28320
 tactaaaaat taaaggcaaa taccatacat ttaaatgggc caaataattg agcagaaaat 28380
 ttacaaaagg ctaaagaaat gtttgaaaat gtgctcaagt tcaataataa agaaacatga 28440
 ggcagaattt ttaactattt gtaaaaaatt tgaagtatct cactactgtca tgacatattg 28500
 aaactttgca cccagtaaac ttacttctga gaatttggtc tcacgaagtc accaccaact 28560
 tataacagtt actatatatt agttataatt ataggtcttt ttttctattt tatacaattc 28620
 ttttttaatg ttttcaattt taaagtttaa aaaattaagt gatattagta cttgcaaatt 28680
 gacaatgttt actaattttt ttcttggttc cttttttgt ttgtttgttt ttttgagaca 28740
 gggctctact ctgttgcca ggctggagt cagtggtgca atctcggctc actgcaacct 28800
 ccacctcca ggctcaagca atcctcccat ctacgcctcc taagtaggtg ggactatagg 28860
 catgcaccgc cacacctggc taatttttgt gttgttttgt agagatgatg tttcaccatg 28920
 tttcccaggc tggctctgaa ctcccaggct caaacaatcc acccacctta gtctcctaaa 28980
 gttctgggat tactggcatg agccaccatg cctggcccta cctgttattt ctttatgatc 29040
 tgttaaacta ggaagtgata tataaatatc ctataatgga ttattttgtt cttcagcaag 29100
 caacctgatt tgaaaataat aatcatatat gtacataaat ttatagtgtt ctattttctc 29160
 tttaggaaaa taaggaaaa caagaaagaa ttgaacgaaa acagaagaaa cgtcattcct 29220
 ttcttgaaag tgaggcactt cctccgtgga gccctccaag cagaactgtg ttcgcaaaag 29280
 tgttttgata attctagttc ttacattatt tggttattta tcggtttgcc aatattagcc 29340
 atagatttaa aaccattcaa ttatttatag ttagaggaat atattttaat taaatgccag 29400
 acactcctgc tgacaatgaa agaaatactt tgggaatgaa tcagtgaag catTTTTTTg 29460
 aactgtagat aaactgcctc aaacaaagac ctaataatca gattgttttt accattaaga 29520

F644-88.ST25

tacataagat tttatcatgt cctgataatt cttatgggtgg agtgattcat gatctttttc 29580
 attaagctct gtatgttatt taagtatatt taattccagt aataaaaagg aaatcatcta 29640

 ggtaccataa tgatagaaat tattcctttt gtggatgatt gtgaatctag attcagggtt 29700
 ttaaatagaag ggtcgtggtg aagtgcgcat atattattcc ttctgaaact 29750

<210> 17

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo-sapiens

<400> 17
 acttccttcg tctgggtggt tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttggtga 60
 cccgagagac ccggcgggtgg ggaagtcact tcctcccgaa gacgctgttt cctagcaacc 120
 gccctccgcc tcigtattta gcccctcctc ctgctcgggt ccaggaccgg ctctgcgggc 180
 gccgccaggc ccagaccaag 200

<210> 18

<211> 139

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18
 ctactatcag aagtgaatt ctaataatta gctattttat aaaggtaacg agaaaaaata 60
 cactatgtct gatgaagttt ttagcaccac tttggcatat acaaagagtc caaaagttac 120
 caaaagaact actttccag 139

<210> 19

<211> 85

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19
 gatgagctaa taagagcaat tacagctcgc tcagccagac aaaggagttc tgaatactca 60
 gatgactttg acagtgatga gattg 85

<210> 20

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 20
tttcttttagg tgatttttct gacacttcag cagatgaaaa ttcagttaat aaaaaaatga    60
atgactttica tatatcagat gatgaagaaa agaatccttc aaaactattg tttttgaaaa    120
ccaataaatc aaacggtaac ataaccaag atgagccagt gtgtgccatc aaaaatgaag    180
aggaaatggc acctgatggg tgtgaagaca ttgttgtaaa atcttttctt gaatctcaaa    240
ataaggatga ggaatttgaa aaagacaaaa taaaaatgaa acctaaaccc agaattcttt    300
caattaaaag cacatcttca g                                           321

```

<210> 21

<211> 227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 21
cagaaaaacaa cagccttgac acagatgatc acttttaaacc atcacctcgg ccaaggagta    60
tgttgaaaaa gaaaagtcac atggaggaga aggatggact agaagataaa gaaactgccc    120
tcagtgaaga attggagtta cattctgcac cttcttcctt tccaacgccg aatggcatac    180
aattagaagc tgagaaaaaa gcattctctg aaaaccttga tcctgag                227

```

<210> 22

<211> 94

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 22
gattcatgct taacaagtct agcatcatca tcacttaaac aaattcttgg agattctttt    60
tcaccaggat ctgagggaaa cgcattctgga aaag                                94

```

<210> 23

<211> 248

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 23
atccaaatga agaaatcact gaaaaccata attccttgaa atcagatgaa aataaagaga    60

```


F644-88.ST25

attcattttc agcagaccat gtgactactg cagttgagaa atccaaggaa agtcaagtga 120
 ctgctgatga ccttgaagaa gaaaaggcaa aagcggaact gattatggat gatgacagaa 180
 cagttgatcc actactatct aaatctcaga gtatcttaat atctaccagt gcaacagcat 240
 cttcaaag 248

<210> 24

<211> 71

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24
 aaaacaattg aagatagaaa tataaagaat aaaaagtcaa caaataatag agcatccagt 60
 gcatctgccca g 71

<210> 25

<211> 169

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25
 attaatgacc tctgagtttt tgaagaaatc tagttctaaa aggagaactc catcgacaac 60
 tacctcttct cactatttag ggacttttaa agtcttggac caaaaacctt cacagaaaca 120
 gagcatagaa cctgatagag cagataacat aagggcagct gtttatcag 169

<210> 26

<211> 90

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26
 gagtggttag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa aagaattgaa 60
 agtgaaaact taaggatcca aaatgaacag 90

<210> 27

<211> 160

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27
 aaaaaagctg ctaaaagaga agaagcatta gcatcatttg aggcctggaa ggctatgaaa 60
 gaaaaggaag caaagaaaat agctgccaaa aagaggcttg aagaaaaaaa caagaagaaa 120
 actgaagaag aaaatgctgc aagaaaagga gaagcactac 160

~~<210> 28~~

~~<211> 146~~

~~<212> DNA~~

~~<213> Homo sapiens~~

~~<400> 28~~
 gcttttgaaa aatggaaaga gaaaaagatg gaatatctta aagagaaaaa tagaaaggag 60
 agagaatatg aaagagcaaa gaaacagaaa gaggaggaaa ctgttgccga gaaaaagaaa 120
 gataatttaa ctgctgttga gaaatg 146

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29
 gaatgaaaaa aaggaagctt ttttcaagca aaaggaaaaa gaaaaataa atgagaaaag 60
 aaaggaagaa ctgaaaagag ctgagaaaaa agataaagat aaacaagcta ttaatgaata 120
 tgaaaaatgg ctg 133

<210> 30

<211> 485

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30
 gaaaaataagg aaaaacaaga aagaattgaa cgaaaacaga agaaacgtca ttcctttcct 60
 gaaagtgagg cacttctctc gtggagccct ccaagcagaa ctgtgttcgc aaaagtgttt 120
 tgataattct agttcttaca ttatttggtt atttatcggt ttgccaatat tagccataga 180
 tttaaaacca ttcaattatt tatagttaga ggaatatatt ttaattaaat gccagacact 240
 cctgctgaca atgaaagaaa tactttggaa tgtaatcagt gaaagcattt ttttgaactg 300
 tagataaact gcctcaaaca aagacctaat aatcagattg tttttacat taagatacat 360

aagattttat catgtcctga taattcttat ggtggagtga ttcatgatct ttttcattaa 420

-----gctctgtatg ttatttaagt atatttaatt ccagtaataa aaaggaaatc atctaggtac 480

cataa 485

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 31
atgtctgatg aagtttttag cacc 24

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 32
aggcctcaaa tgatgctaataat gc 22

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 33
atcatittgag gcctggaagg c 21

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 34
aaacactttt gcgaacacag ttc

23

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 35
acaacgaata acagagtgtc c

21

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 36
actcctgata aacagctgcc

20

<210> 37

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 37
gccaccatgt ctgatgaagt ttttagcac

29

<210> 38

F644-88.ST25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 38
gaaacacttt tgcgaacaca gtgc

24

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 39
taatgtctga tgaagttttt agcacc

26

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 40
tcaaaacact tttgcgaaca cagttc

26

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 41
aatgtctgat gaagttttta gcacc

25

<210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 42
 tcagcttgcc gtaggtggc

19

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 43
 atggctcctgc tggagttcg

19

<210> 44

<211> 391

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<400> 44
 aaagaagtga agacagaaac acgaagaata aaaagacaac gaataacaga gtgtccagtg 60
 cctctggcag gctgatgacc tctgagtttt taaagagatc cgggtcccaca aaaagaagtc 120
 catctgcagc tacctcctca cactatittag ggagtttgaa agtcttggac cagaagcaac 180
 cacggaagca gagcctagag ccagacaagg ctgatcacat aagggcagct gtttatcagg 240
 agtggttaga aaagaaaaat gtgtatttac atgaaatgca cagaataaaa agaattgaaa 300
 gcgaaaactt gaggatccaa aatgaacaga aaaaagctgc taagagagag gaagccctgg 360
 catcatttga ggcctggaag gcaatgaaag a 391



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI


N° 11235*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 1..



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75300 Paris Cedex 03
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 3 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif) BLO/CGA/cp644/88FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 02.16.648

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	GIORGI
	Prénoms	Dominique
Adresse	Rue	391 rue du mas du juge
	Code postal et ville	34980 SAINT GELY DU FESC
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROQUIER
	Prénoms	Sylvie
Adresse	Rue	391 rue du mas du juge
	Code postal et ville	34980 SAINT GELY DU FESC
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	SAFFIN
	Prénoms	Jean-Michel
Adresse	Rue	59 rue Michel Teule, Rés. Parc d'Alco, Appt 125
	Code postal et ville	34080 MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

Le 24 décembre 2002

Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)

PCT/FR2003/003895



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.